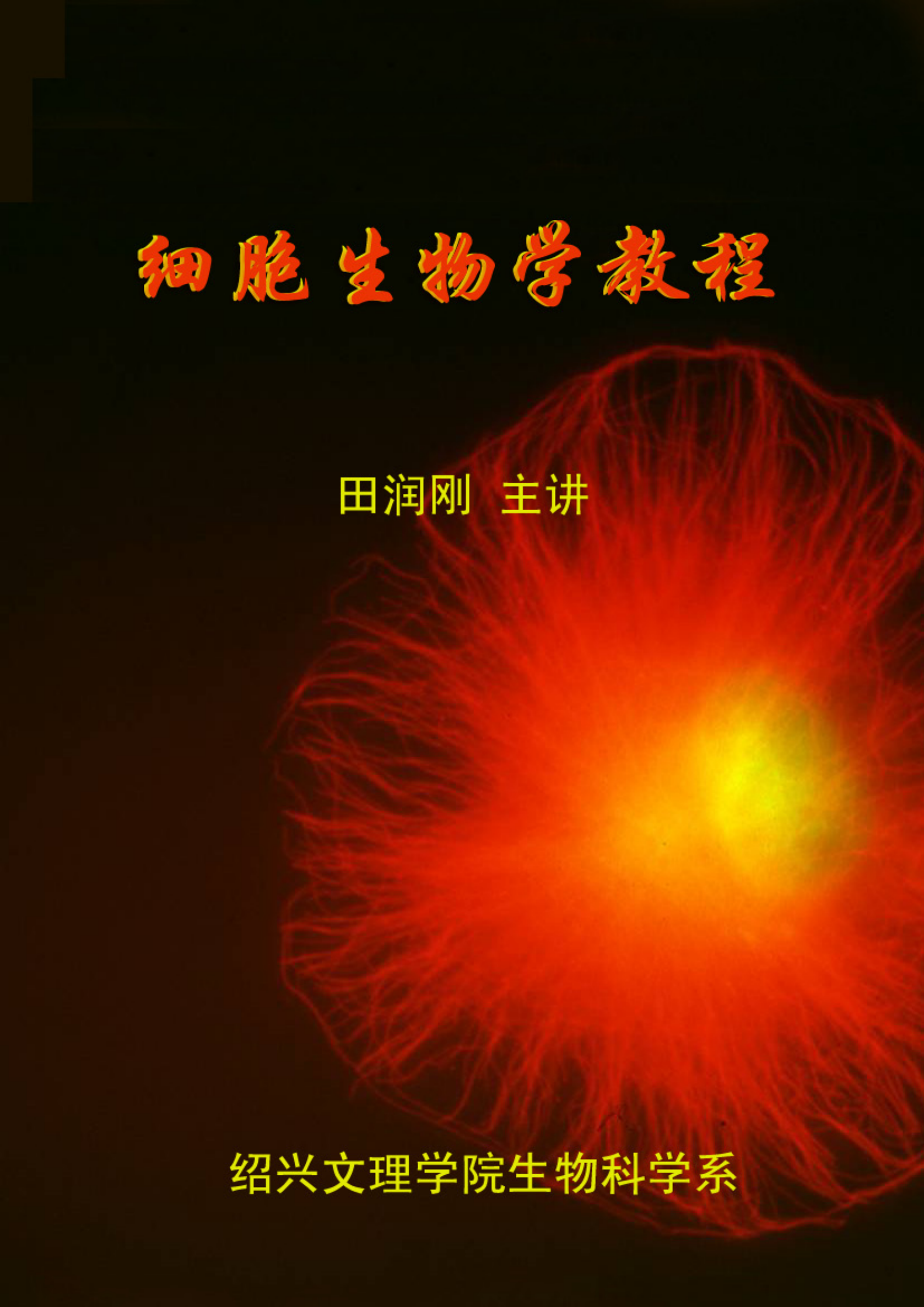
细胞生物学教程

田润刚 主讲



绍兴文理学院生物科学系

一小段序言

很多朋友通过电话和 MAIL 询问购买这个教程，但遗憾的是它从未被正式出版过，而且以后也不打算出版，就让它在网络中成长吧。虽然我已尽了很大的努力，但是面对知识的海洋，仍然感到非常无助，错误依然不少，需要改进的还是地方很多，但让我感到欣慰的是这本教材得到了高校师生和朋友们的热情支持，这就像寒冷无助之中看到了冉冉的篝火，鼓舞着我继续努力做好。

这本教材里的观点还是比较接近学科实际发展水平，但由于涉及文献太多，没有来得及整理，未能做好文献目录，凡是对教材内容有疑问的朋友可通过 tian@cella.cn 或者 0575-8345002 索取原始文献，这些文献主要来自于 Elsevier，Springer，Nature 和 Science 的数据库。文中的图片资料主要来源于期刊文献、互联网和教科书，由于时间仓促，部分材料未注明出处，请原作者谅解！

明知道
山的那边还是山
海的尽头还是海
我却执意要去流浪

背起空空的行囊
告别昨日的惆怅
让灵魂如出笼的小鸟
在蓝天下自由的歌唱

昔日的功名
是金色的牢框
无休的物欲
侵蚀了青春的光芒
我轻轻地将一切舍弃
然后轻轻地随风而起
如一粒草种
飞向那撒满阳光的地方

蓝蓝的天空
任我飞翔
无垠的草原
是我的天堂
我悄悄地成长
悄悄地绽放
如无名的小草
不错过每一份雨露阳光

绍兴文理学院生物科学系 田润刚博士 2004 年 12 月 7 日星期二于绍兴

目　　录

第一章 历史与展望 3
第一节 细胞生物学简史 3
第二节 当代细胞生物学研究内容 9
第三节 对未来的展望 10
第二章 细胞生物学实验技术 13
第一节 显微技术 13
第二节 生物化学与分子生物学技术 27
第三节 细胞分离技术 31
第四节 细胞培养与细胞杂交 34
第三章 细胞生物学基础知识 38
第一节 真核细胞 38
第二节 原核细胞与古核细胞 43
第三节 病毒与蛋白质感染因子 57
第四节 细胞的化学成分 65
第四章 质膜及其表面结构 72
第一节 质膜的化学组成 72
第二节 质膜的结构 77
第三节 细胞表面的分化 83
第五章 跨膜运输 88
第一节 被动运输 88
第二节 主动运输 95
第三节 膜泡运输的基本概念 100
第六章 细胞内功能区隔与蛋白质分选 104
第一节 蛋白质分选的基本原理 104
第二节 膜泡运输 106
第三节 内质网 121
第四节 高尔基体 125
第五节 溶酶体与过氧化物酶体 129
第七章 线粒体与叶绿体 136
第一节 线粒体 136
第二节 叶绿体 149
第三节 线粒体与叶绿体的蛋白质定向转运 156
第八章　细胞通信 162
第一节 基本概念 163
第二节 膜表面受体介导的信号转导 168
第三节 胞内受体介导的信号传导 186
第四节 蛋白降解与信号转导 189
第九章 细胞骨架 195
第一节 微丝 196
第二节 微管 204
第三节 中间纤维 211

第十章　细胞外基质 215
第一节 细胞外基质的大分子组成成分 215
第二节 细胞外基质的生物学作用 224
第十一章 细胞连接与细胞粘附分子 225
第一节 细胞连接 225
第二节 细胞粘附分子 235
第十二章 细胞核 242
第一节 核被膜 243
第二节 染色体 248
第三节 核仁 261
第四节 核基质 264
第十三章 细胞周期 266
第一节 基本概念 266
第二节 有丝分裂 269
第三节 减数分裂 276
第四节 细胞周期的调控 280
第十四章　细胞分化 292
第一节 受精与胚胎发育 292
第二节 细胞分化的主要机制 297
第三节 模式动物——果蝇 307
第四节 细胞的分化潜能 309
第十五章 细胞衰老与死亡 313
第一节 细胞衰老 313
第二节 细胞坏死与凋亡 318
第三节 细胞凋亡的分子机理 321
第十六章 肿瘤细胞 328
第一节 癌细胞的主要特征 328
第二节 肿瘤形成 330
第三节 肿瘤的诊断与治疗 342

第一章 历史与展望

细胞生物学 Cell Biology 是研究细胞结构、功能及生活史的一门科学。细胞生物学由细胞学 Cytology 发展而来，Cytology 是指对细胞形态（特别是染色体形态）的观察。现代细胞生物学从显微水平，超微水平和分子水平等不同层次研究细胞的结构、功能及生命活动。它与分子生物学，神经生物学和生态学并列为生命科学的四大基础学科。

第一节 细胞生物学简史

从研究内容来看细胞生物学的发展可分为三个层次，即：显微水平、超微水平和分子水平。从时间纵轴来看细胞生物学的历史大致可以划分为四个主要的阶段：

第一阶段：从 16 世纪末—19 世纪 30 年代，是细胞发现和细胞知识的积累阶段。

第二阶段：从 19 世纪 30—20 世纪中期，细胞学说形成后，主要进行细胞显微形态的研究。

第三阶段：从 20 世纪 30 年代—70 年代，以细胞超微结构、核型、带型研究为主要内容。

第四阶段：从 20 世纪 80 年代分子克隆技术的成熟到当前，细胞生物学与分子生物学的结合愈来愈紧密，基因调控、信号转导、细胞分化和凋亡、肿瘤生物学等领域成为当前的主流研究内容。

一、显微镜的发明与细胞的发现

没有显微镜就不可能有细胞学诞生。

1. 1590 荷兰眼镜制造商 J.Janssen 和 Z.Janssen 父子制作了第一台复式显微镜，尽管其放大倍数不超过 10 倍，但具有划时代的意义。

2. 1665 英国人 Robert Hook 用自己设计与制造的显微镜（放大倍数为 40-140 倍，图 1-1)观察了软木（栎树皮)的薄片，第一次描述了植物细胞的构造，并首次用拉丁文 cella（小室)这个词来称呼他所看到的类似蜂巢的极小的封闭状小室（实际上只是观察到到纤维质的细胞壁)。

3. 1672，1682 英国人 Nehemaih Grew 出版了两卷植物显微图谱，注意到了植物细胞中细胞壁与细胞质的区别。

4. 1680 荷兰人 A. van Leeuwenhoek 成为皇家学会会员，一生中制作了 200 多台显微镜和 500 多个镜头（图 1-2）。他是第一个看到活细胞的人，观察过原生动物、人类精子、鲑鱼的红细胞、牙垢中的细菌等等。

5. 1752 英国望远镜商人 J. Dollond 发明消色差显微镜。

图 1-1 Robert Hook 和他的显微镜

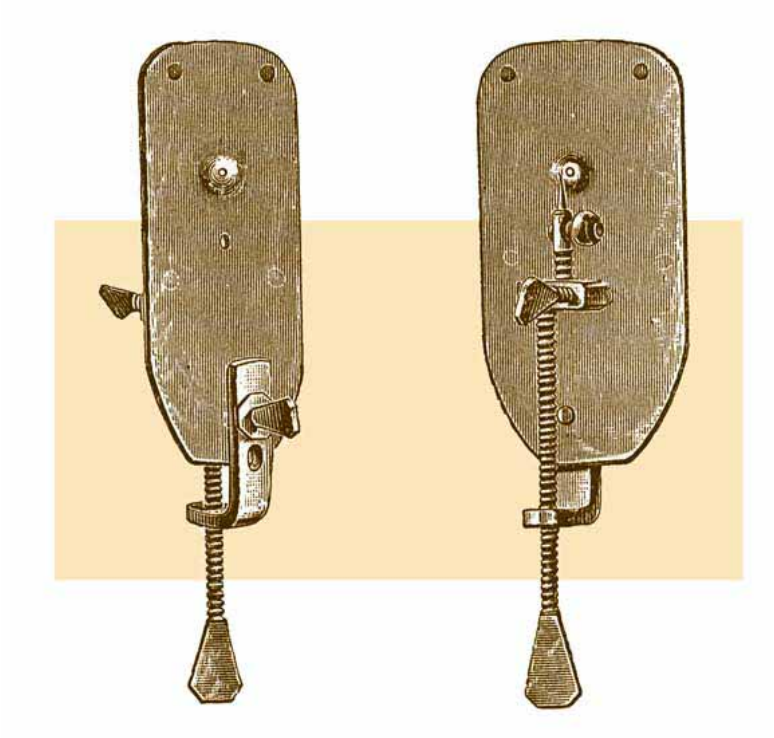


图 1-2 A. van Leeuwenhoek 的显微镜（图片来自 http://www.arsmachina.com）

6. 1812 苏格兰人 D. Brewster 发明油浸物镜，并改进了体视显微镜。

7. 1886 德国人 Ernst Abbe 发明复消差显微镜，并改进了油浸物镜，至此普通光学显微镜技术基本成熟。

8. 1932 德国人 M. Knoll 和 E. A. F. Ruska 描述了一台最初的电子显微镜，1940 年美国和德国制造出分辨力为 0.2nm 的商品电镜。

9. 1932 荷兰籍德国人 F. Zernike 成功设计了相差显微镜（phasecontrast

microscope) ，并因此获 1953 年诺贝尔物理奖。

10. 1981 瑞士人 G. Binnig 和 H. Roherl 在 BM 苏黎世实验中心（Zurich Research Center）发明了扫描隧道显微镜而与电镜发明者 Ruska 同获 1986 年度的诺贝尔物理学奖。

二、细胞学说

在十九世纪以前许多学者的工作都着眼于细胞的显微结构方面，从事形态上的描述，而对各种有机体中出现细胞的意义一直没有作出理论的概括，直到 19 世纪 30 年代德国人施莱登 Matthias Jacob Schleiden 、施旺 Theodar Schwann 提出：一切植物、动物都是由细胞组成的，细胞是一切动植物的基本单位。这一学说即“细胞学说（Cell Theory)”，在 19 世纪已有不少科学家的工作对细胞学说的创立做出了很大的贡献，如：

1．Jean-Baptiste de Lamark （1744~1829)，获得性遗传理论的创始人，法国退伍陆军中尉，50 岁成为巴黎动物学教授，1909 年他认为只有具有细胞的机体，才有生命。“It has been recognized for a long time that the membranes which form the envelopes of the brain，of the nerves，of vessels，of all kinds of glands，of viscera，of muscles and their fibers，and even the skin of the body are in general the productions of cellular tissue。 But no one，so far as I know， has yet perceived that cellular tissue is the general matrix of all organization and that without this tissue no living body would be able to exist，nor could it have been formed。”

2．Charles Brisseau Milbel（1776~1854)，法国植物学家，1802 年认为植物的每一部分都有细胞存在，“the plant is wholly formed of a continuous cellular membranous tissue。Plants are made up of cells，all parts of which are in continuity and form one and the same membranous tissue。”。

3．Henri Dutrochet （1776~1847)，法国生理学家，1824 年进一步描述了细胞的原理，他认为 “All organic tissues are actually globular cells of exceeding smallness，which appear to be united only by simple adhesive forces; thus all tissues， all animal (and plant) organs, are actually only a cellular tissue variously modified。This uniformity of finer structure proves that organs actually differ among themselves merely in the nature of the substances contained in the vesicular cells of which they are composed” 。

4．Matthias Jacob Schleiden（1804~1881)，德国植物学教授[1]，1938 年发表“植物发生论”(Beiträge zur Phytogenesis)，认为无论怎样复杂的植物都有形形色色的细胞构成。他认识到了 Brown 发现细胞核的重要意义，这一点 Brown 本人并未做到，他试图重建细胞发育的过程，为此他聪明地选择了胚胎细胞作为他研究的起点，他还在细胞中发现了核仁。

[1]德国植物学教授，性格暴躁、反复无常。原在 Heiderberg 学法律，后来在 Hamberg 当律师，因工作不顺利自杀而未遂。枪伤痊愈后在哥廷根大学和柏林大学研究植物学和医学，获博士学位

5. Theodor Schwann（1810~1882)，德国解剖学教授，一开始就研究Schleiden的细胞形成学说，他完全接受了这个学说，并把它扩展为所有生命现象的起源和基础的一般理论。他把 Schleiden 在植物中的发现应用到动物中去，并于 1838 年提出了“细胞学说”（Cell Theory)这个术语；1939 年发表了“关于动植物结构和生长一致性的显微研究”(Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen)。因此细胞学说的创立被认为归功于 Schleiden 和 Sehwann 两个人，而且年份也被定到 1839 年。

Schwann 提出：

1) 有机体是由细胞构成的；

2) 细胞是构成有机体的基本单位。

1855 德国人 R. Virchow 提出“一切细胞来源于细胞”（omnis cellula e cellula）的著名论断，进一步完善了细胞学说。

把细胞作为生命的一般单位，以及作为动植物界生命现象的共同基础的这种概念立即受到了普遍的接受。恩格斯将细胞学说誉为 19 世纪的三大发现之一。

三、细胞生物学的发展

19 世纪后期显微技术的改进，生物固定技术（如：Fleming 1882，1884；Canoy 1886）和染色技术的出现极大的方便了人们对细胞显微结构的认识，各种细胞器相继被发现，20 世纪 30 年代电子显微镜技术的问世，是细胞形态的研究达到了空前的高潮。20 世纪 50 年代分子生物学的兴起，推动细胞生物学的研究进入了分子水平。

1. 1831 英国人 Robert Brown 发现植物细胞核。

2. 1832 德国人？C. J. Dumortier 观察了藻类的细胞分裂，并认为细胞来源于原来存在的细胞。

3. 1835 德国人 H. von Molh 仔细观察了植物的细胞分裂，认为是植物的根和芽尖极易观察到的现象。

4. 1835 法国人 F. Dujardin 观察动物活细胞时发现“肉样质”（Sarcode)。

5. 1839 捷克人 J. E. Pukinye 用 protoplasm 这一术语描述细胞物质，“Protoplast”为神学用语，指人类始祖亚当。

6. 1841 波兰人 R. Remak 发现鸡胚血细胞的直接分裂（无丝分裂)。

7. 1846 德国人 H. von Mohl 研究了植物原生质，发表了“identifies protoplasm as the substance of cells”。

8. 1848 德国人 W. Hofmeister 描绘了鸭跖草 *Tradescantia* 的花粉母细胞，明确的体现出染色体，但他没有认识到之一重要性，40 年后德国人 H. von Waldeyer 因这一结构可被碱性染料着色而定名为 Chromosome。

9. 1861 德国人 M. Shultze 认为动物细胞内的肉样质和植物体内的原生质具有同样的意义。他给细胞的定义是：“the cell is an accumulation of living substance or protoplasm definitely delimited in space and possessing a cell membrane and

nucleus。”

10.1864 德国人 Max Schultze 观察了植物的胞间连丝。

11.1865 德国人 J. von Suchs 发现叶绿体。

12.1866 奥地利人 G. Mendel 发表了对豌豆的杂交试验结果，提出遗传的分离规律和自由组合规律。

13.1868 英国人 T. H. Huxley 在爱丁堡作题为“生命的物质基础”（the physical basis of life）的演讲报告时首次把原生质的概念介绍给了英国公众。

14.1869 瑞士人 F. Miescher 从脓细胞中分离出核酸。

15.1876 德国人 O.Hertwig 发现海胆的受精现象，其论文题目为“observe the fertilization of a sea urchin egg”。

16.1879 德国人 W. Flemming 观察了蝾螈细胞的有丝分裂，于 1882 年提出了 mitosis 这一术语。后来德国人 E. Strasburger(1876~80)在植物细胞中发现有丝分裂，认为有丝分裂的实质是核内丝状物（染色体)的形成及其向两个子细胞的平均分配，动植物的受精实质上是父本和母本配子核的融合，并于 1984 提出了 Prophase 和 Metaphase 的概念。

17.1882 德国人 E. Strasburger 提出细胞质（cytoplasm）和核质（nucleoplasm）的概念。

18.1883 比利时人 E. van Beneden 证明马蛔虫 *Ascaris megalocephala* 配子的染色体数目是体细胞的一半，并且在受精过程中卵子和精子贡献给合子的染色体数目相等。

19.1883 比利时人 E. van Beneden 和德国人 T. Boveri 发现中心体。

20.1884 德国人 O.Hertwig 和 E. Strasburger 提出细胞核控制遗传的论断。

21.1886 德国人 A. Weismann 提出种质论。

22.1890 德国人 Richard Altmann 描述了线粒体的染色方法，他推测线粒体就像细胞的内共生物，并认为线粒体与能量代谢有关。他还于 1889 年提出了核酸的概念。

23.1892 德国人 T. Boveri 和 O. Hertwig 研究了减数分裂的本质，并描述了染色体联会现象。

24.1898 意大利人 C. Golgi 用银染法观察高尔基体。

25.1900 孟德尔在 34 年前发表的遗传法则被重新发现。

26.1905 美国人 Clarence McClung shows that female mammals have 2 X chromosomes and that males have an X and a Y

27.1908 美国人 T. H. Morgan 以 *Drosophila melanogaster* 为材料开始著名的遗传学实验，1910 年提出遗传的染色体理论，1919 年发表“遗传的本质”（Physical Basis of Heredity）。1926 年发表“基因学说”（The Theory of the Gene）

28.1910 德国人 A. Kossel 获得诺贝尔生理医学奖，他首先分离出腺嘌呤、胸腺嘧啶和组氨酸。

29. 1935 美国人 W. M. Stanley 首次得到烟草花叶病毒的结晶体。

30.1940 德国人 G. A. Kausche 和 H. Ruska 发表了世界第一张叶绿体的电镜照片。

31.1941 美国人 G. W. Beadle 和 E. L. Tatum 提出一个基因一个酶的概念。

32. 1944 美国人 O. Avery，C. Macleod 和 M. McCarthy 等人通过微生物转化试验证明 DNA 是遗传物质。

33. 1945 美国的 K. R. Porter、A. Claude 和 E. F. Fullam 发现小鼠成纤维细胞中的内质网。

34. 1949 加拿大人 M. Bar 发现巴氏小体。

35. 1951 美国人 James Bonner 发现线粒体与细胞呼吸有关。

36. 1953 美国人 J. D. Watson 和英国人 F. H. C. Crick 提出 DNA 双螺旋模型。

37. 1955 比利时人 C. de Duve 发现溶酶体和过氧化物酶体。

38. 1955 美国人 Vincent Du Vigneaud 因人工合成多肽而获诺贝尔奖

39. 1956 年，蒋有兴（美籍华人）利用徐道觉发明的低渗处理技术证实了人的 2n 为 46 条，而不是 48 条。

40. 1957 J. D. Robertson[2]用超薄切片技术获得了清晰的细胞膜照片，显示暗-明-暗三层结构。

41. 1961 英国人 P. Mitchell 提出线粒体氧化磷酸化偶联的化学渗透学说，获 1978 年诺贝尔化学奖。

42. 1961~64 美国人 M. W. Nirenberg 破译 DNA 遗传密码。

43. 1968 瑞士人 Werner Arber 从细菌中发现 DNA 限制性内切酶。

44. 1970 美国人 D. Baltimore、R. Dulbecco 和 H. Temin 由于发现在 RNA 肿瘤病毒中存在以 RNA 为模板，逆转录生成 DNA 的逆转录酶而获 1975 共享诺贝尔生理医学奖。

45. 1971 美国人 Daniel Nathans 和 Hamilton Smith 发展了核酸酶切技术。

46. 1973 美国人 S. Cohen 和 H. Boyer 将外源基因拼接在质粒中，并在大肠杆菌中表达，从而揭开基因工程的序幕。

47. 1975 英国人 F. Sanger 设计出 DNA 测序的双脱氧法。于 1980 年获诺贝尔化学奖。此外 Sanger 还由于 1953 年测定了牛胰岛素的一级结构而获得 1958 年诺贝尔化学奖。

48. 1982 美国人 S. B. Prusiner 发现蛋白质因子 Prion，更新了医学感染的概念，于 1997 年获诺贝尔生理医学奖。

49. 1983 美国人 K. B. Mullis 发明 PCR 仪，1987 年发表了 “Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction”，于 1993 年获诺贝尔化学奖。

50. 1984 德国人 G. J. F. Kohler、阿根廷人 C. Milstein[3]和丹麦科学家 N. K. Jerne 由于发展了单克隆抗体技术，完善了极微量蛋白质的检测技术而分享了诺贝尔生理医学奖。

51. 1989 美国人 S. Altman 和 T. R. Cech 由于发现某些 RNA 具有酶的功能(称为核酶)而共享诺贝尔化学奖。Bishop 和 Varmus 由于发现正常细胞同样带有原癌基因而分享当年的诺贝尔生理医学奖。

52. 1997 多利羊在卢斯林研究所诞生，成为世纪末的重大新闻。多利是 Ian

[2] 1957. New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3:1043-1047.
1959 The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem. Soc. Symp.* 16: 3-43

[3] 出生于阿根廷，具有英国和阿根廷国籍，在美国获奖。

Wilmut 领导的研究小组克隆的（图 1-3）。

53. 1998 美国人 T. Wakayama 和 R. Yanagimachi 成功地用冻干精子繁殖出小鼠。

54. 2000 世界首例克隆猪在苏格兰诞生，是由 Alan Coleman 领导的研究小组克隆的。

图 1-3 多利和邦妮（图片来自 http://www.ri.bbsrc.ac.uk）

55. 2001 美国人 Leland Hartwell、英国人 Paul Nurse、Timothy Hunt 因对细胞周期调控机理的研究而获诺贝尔生理医学奖。

56. 2002 英国人 Sydney Brenner、美国人 H. Robert Horvitz 和英国人 John E. Sulston，因在器官发育的遗传调控和细胞程序性死亡方面的研究获诺贝尔诺贝尔生理学或医学奖。

57. 2003 美国科学家 Peter Agre 和 Roderick MacKinnon，分别因对细胞膜水通道，离子通道结构和机理研究而获诺贝尔化学奖。

第二节 当代细胞生物学研究内容

第一、认识细胞生物学课程的重要性，正如原子是物理性质的最小单位，分子

是化学性质的最小单位，细胞是生命的基本单位。50 年代以来诺贝尔生理与医学奖大都授予了从事细胞生物学研究的科学家，可见细胞生物学的重要性。如果你将来打算从事生物学相关的工作，学好细胞生物学能加深你对生命的理解。

第二、明确细胞生物学的研究内容，即：结构、功能、生活史。生物的结构与功能是相适应的，每一种结构都有特定的功能，每一种功能的实现都需要特定的物质基础。如肌肉可以收缩、那么动力是谁提供的、能量从何而来的？

第三、从显微、超微和分子三个层次来认识细胞的结构与功能。一方面每一个层次的结构都有特定的功能，另一方面各层次之间是有机地联系在一起的。

第四、将所学过的知识关联起来，多问自己几个为什么。细胞生物学涉及分子生物学、生物化学、遗传学、生理学等几乎所有生物系学过的课程，将学过的知识与细胞生物学课程中讲到的内容关联起来，比较一下有什么不同，有什么相同，为什么？尽可能形成对细胞和生命的完整印象，不要只见树木不见森林。另一方面细胞生物学各章节之间的内容是相互关联的，如我们在学习线粒体与叶绿体的时候，要联想起细胞物质运输章节中学过的 DNP、FCCP 等质子载体对线粒体会有什么影响，学习微管结构时要问问为什么 β 微管蛋白是一种 G 蛋白，而 α 微管蛋白不是，学习细胞分裂时要想想细胞骨架在细胞分裂中起什么作用，诸如此类的例子很多。

第五、紧跟学科前沿，当前的热点主要有“信号转导”、“细胞周期调控”、“细胞凋亡”等。细胞生物学是当今发展最快的学科之一，知识的半衰期很短（可能不足 5 年），国内教科书由于编撰周期较长，一般滞后于学科实际水平 5-10 年左右，课本中的很多知识都已是陈旧知识。有很多办法可以使你紧跟学科前沿：一是选择国外的最新教材，中国图书进出口公司读者服务部 http://link.clubol.com/link/index.php 那里可以买到很多价廉物美的正宗原版教材（一般 200-400 元，只相当于国外价格的 1/5）；二是经常读一些最新的期刊资料，如果条件所限查不到国外资料，可以到中国期刊网、万方数据等数据库中查一些综述文章，这些文章很多都是国家自然科学基金支助的，如在中国期刊网的检索栏输入关键词“细胞凋亡”，二次检索输入关键词“进展”，你会发现一大堆这样的文章，都是汉字写的比读英文省事。

第六、学一点科技史，尤其是生物学史，看看科学家如何开展创造发明，学习他们惊人的毅力、锐敏的眼光和独特的思维。牛顿说过：“我之所以比别人看得更远，是因为站在巨人的肩膀上。”

第三节 对未来的展望

人类经历了漫长的采猎文明后，约在一万年前进入农业经济时代，18 世纪 60 年代，英国率先进入工业经济，20 世纪 50 美国最早走完工业经济的历程，进入信息时代。据专家估计这一经济形态的“寿命”为 75~80 年，到本世纪 20 年代将渐渐失去活力，届时人类迎接下一个经济时代，即生物经济时代的到来，生物经济的资源为基因，其核心技术为建立在细胞与分子生物学理论基础上的各类生物技术。

生物经济时代特点是：

1. 基因克隆和重组技术日趋成熟，人类将根据经济需要去开发和操纵遗传资

源，如通过转基因的方法生产人类生长素、干扰素（每千克价值 440 亿美元）等昂贵的药物；培育具有特殊功能的转基因动植物，如具有苏云金毒素的抗虫棉。在商业目的的驱使下，大量的改造物种，开始了偏离自然进化规律的二次“创世纪”，由此所产生的基因污染和伦理问题将越来越突出。

2. 人类基因组[4]大约 10 万个基因的作图和测序完成，进入以揭示基因功能为主的后基因组计划，人类遗传病的基因治疗成为常规技术。

3. 动物克隆技术和人类干细胞定向分化技术取得突破，人工创建的组织，器官将用于医学治疗的目的。

4. 神经生物学、信息生物学、细胞生物学等学科的发展，为实现人工智能奠定了理论基础。

5. 基因武器可能成为继核武器以后又一种足以令人类毁灭的武器。

6. 生物芯片[5]（图 1-4）技术广泛应用于科研、医疗、农业、食品、环境保护、司法鉴定等领域。成为与晶体管芯片一样重要的产业。

7. 植物光合作用机理研究取得重大突破，人工光解水产生的氢气成为及化石燃料之后主要的能源。

8. 计算机和网络系统为生物经济的遗传信息管理和交流提供了方便。

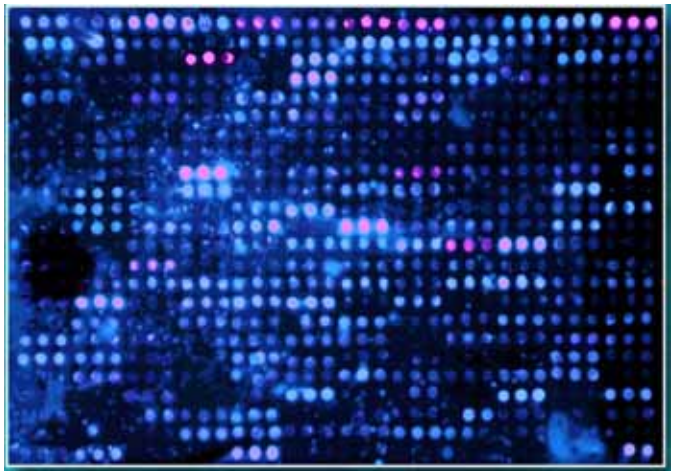


图 1-4 DNA 芯片(图片来自 http://www.ornl.gov)

[4]人类基因组计划（Human genome project）由美国于 1987 年启动，我国于 1993 年加入该计划，承担其中 1%的任务，即人类 3 号染色体短臂上约 30Mb 的测序任务。2000 年 6 月 28 日人类基因组工作草图完成。由于人类基因测序和基因专利可能会带来巨大的商业价值，各国政府和一些企业都在积极地投入该项研究，如 1997 年 AMGE 公司转让了一个与中枢神经疾病有关的基因而获利 3.92 亿美元。

[5]生物芯片技术是通过缩微技术，根据分子间特异性地相互作用的原理，将生命科学领域中不连续的分析过程集成于硅芯片或玻璃芯片表面的微型生物化学分析系统，以实现对细胞、蛋白质、基因及其它生物组分的准确、快速、大信息量的检测。按照芯片上固化的生物材料的不同，可以将生物芯片划分为基因芯片、蛋白质芯片、细胞芯片和组织芯片。目前，最成功的生物芯片形式是以基因序列为分析对象的“微阵列（microarray）”，也被称为基因芯片（Gene chip)或 DNA 芯片（DNA chip)。1998 年 6 月美国宣布正式启动基因芯片计划，联合私人投资机构投入了 20 亿美元以上的研究经费。世界各国也开始加大投入，以基因芯片为核心的相关产业正在全球崛起，目前美国已有 8 家生物芯片公司股票上市，平均每年股票上涨 75%，据统计全球目前生物芯片工业产值为 10 亿美元左右，预计今后 5 年之内，生物芯片的市场销售可达到 200 亿美元以上。

附录 细胞生物学参考书：

1. Bruce Alberts et al. Molecular Biology of the Cell 4th. Garland Science, 2002.
2. Harvey Lodish et al. Molecular Cell Biology 4th. W. H. Freeman and Company, 1999.
3. Gerald Karp. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments 3rd. Wiley & Sons, 2002.
4. 韩贻仁. 分子细胞生物学科学出版社. 2001 年 03 月.
5. 印莉萍, 刘祥林. 分子细胞生物学实验技术. 首都师范大学出版社 2001 年 01 月.
6. 牛富文. 医用分子细胞生物学. 河南医科大学出版社 1997 年 06 月.
7. 罗深秋. 医用细胞生物学.军事医学科学出版社. 1998 年 08 月.
8. 陈诗书. 医学细胞与分子生物学. 上海医科大学出版社. 1999 年 01 月.
9. 周建明. 医学细胞与分子生物学. 上海医科大学出版社 1997 年 06 月.
10. 高文和. 医学细胞生物学. 天津大学.社出版 2000 年 09 月.
11. 左　及. 医学细胞生物学. 上海医科大学出版社 1999 年 06 月.
12. 余从年. 医学细胞生物学导论. 科学出版社. 2000 年 07 月.
13. 郭葆玉. 细胞分子生物学实验操作指南. 安徽科学技术出版社 1998 年 04 月.
14. 王德耀. 细胞生物学. 上海科学技术出版社. 1998 年.
15. 翟中和. 细胞生物学. 高等教育出版社 1995 年 1 月.
16. 翟中和. 细胞生物学. 高等教育出版社 2000 年 8 月.
17. 汪堃仁. 细胞生物学（第二版). 北京师范大学出版社 1998 年 11 月.
18. 郑国锠. 细胞生物学（第二版). 高等教育出版社 1992 年 04 月.
19. 翟中和. 细胞生物学动态，第一卷. 北京师范大学出版社 1997 年 03 月.
20. 翟中和. 细胞生物学动态，第二卷. 北京师范大学出版社 1998 年 10 月.
21. 翟中和. 细胞生物学动态，第三卷. 北京师范大学出版社 1999 年.
22. 辛　华. 细胞生物学实验. 科学出版社. 2001 年 02 月.
23. 刘鼎新. 细胞生物学研究方法与技术(第二版). 北医、协和医大联合出版社 1997 年 05 月.
24. 杨汉民. 细胞生物学实验（第二版). 高等教育出版社 1997 年 07 月.

第二章 细胞生物学实验技术

第一节 显微技术

显微镜是观察细胞的主要工具。根据光源不同，可分为光学显微镜和电子显微镜两大类。前者以可见光（紫外线显微镜以紫外光）为光源，后者则以电子束为光源。

一、光学显微镜

（一）、普通光学显微镜

普通生物显微镜由 3 部分构成，即：①照明系统，包括光源和聚光器；②光学放大系统，由物镜和目镜组成，是显微镜的主体，为了消除球差和色差，目镜和物镜都由复杂的透镜组构成；③机械装置，用于固定材料和观察方便（图 2-1）。

图 2-1 尼康 E-600 显微镜

显微镜物象是否清楚不仅决定于放大倍数，还与显微镜的分辨力（resolution）有关，分辨力是指显微镜（或人的眼睛距目标 25cm 处）能分辨物体最小间隔的能力，分辨力的大小决定于光的波长和镜口率以及介质的折射率，用公式表示为：

$$R=0.61\lambda / N.A.\quad N.A.=n\sin\alpha/2$$

式中：**n=**介质折射率；**α=**镜口角（标本对物镜镜口的张角），*N.A.*=镜口率（numeric aperture）。镜口角总是要小于 180°，所以 sina/2 的最大值必然小于 1。

表 2-1 及中介质的折射率

介质	空气	水	香柏油	α 溴萘
折射率	1	1.33	1.515	1.66

制作光学镜头所用的玻璃折射率为 1.65~1.78，所用介质的折射率越接近玻璃的越好。对于干燥物镜来说，介质为空气，镜口率一般为 0.05~0.95；油镜头用香柏油为介质，镜口率可接近 1.5。

普通光线的波长为 400~700nm，因此显微镜分辨力数值不会小于 0.2μm，人眼的分辨力是 0.2mm，所以一般显微镜设计的最大放大倍数通常为 1000X。

（二）、荧光显微镜

图 2-2 尼康 E800 荧光 DIC 显微镜

细胞中有些物质，如叶绿素等，受紫外线照射后可发荧光；另有一些物质本身虽不能发荧光，但如果用荧光染料或荧光抗体染色后，经紫外线照射亦可发荧光，荧光显微镜（图 2-2，3，4）就是对这类物质进行定性和定量研究的工具之一。

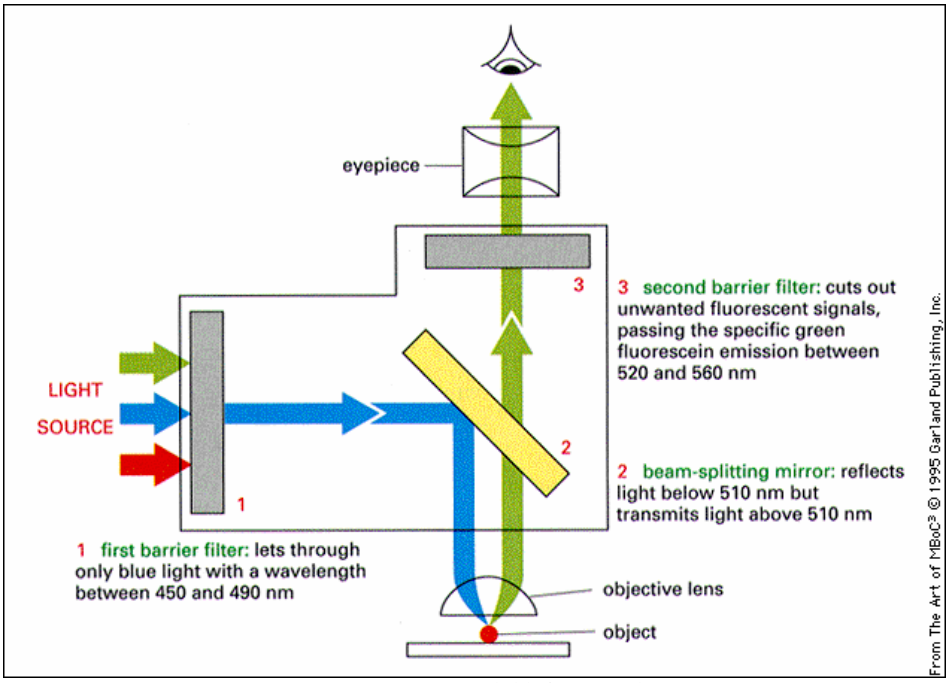


图 2-3 落射式照明原理

荧光显微镜和普通显微镜有以下的区别：

1. 照明方式通常为落射式，即光源通过物镜投射于样品上（图 2-3）；
2. 光源为紫外光，波长较短，分辨力高于普通显微镜；
3. 有两个特殊的滤光片，光源前的用以滤除可见光，目镜和物镜之间的用于滤除紫外线，用以保护人目。

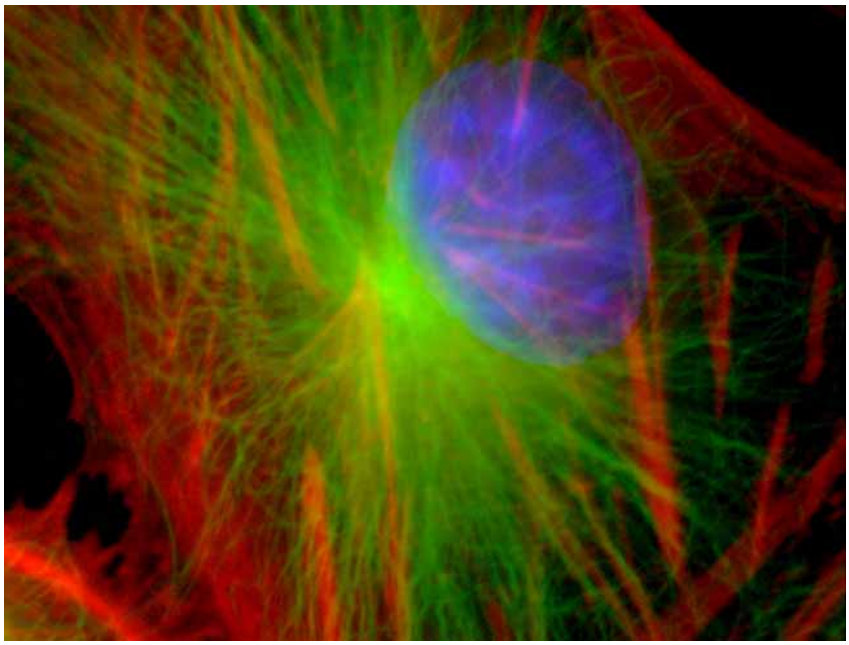


图 2-4 荧光显微镜照片（微管呈绿色、微丝红色、核蓝色），图片来自 http://www.itg.uiuc.edu

（三）、激光共聚焦扫描显微境

图 2-5 激光共聚焦扫描显微镜

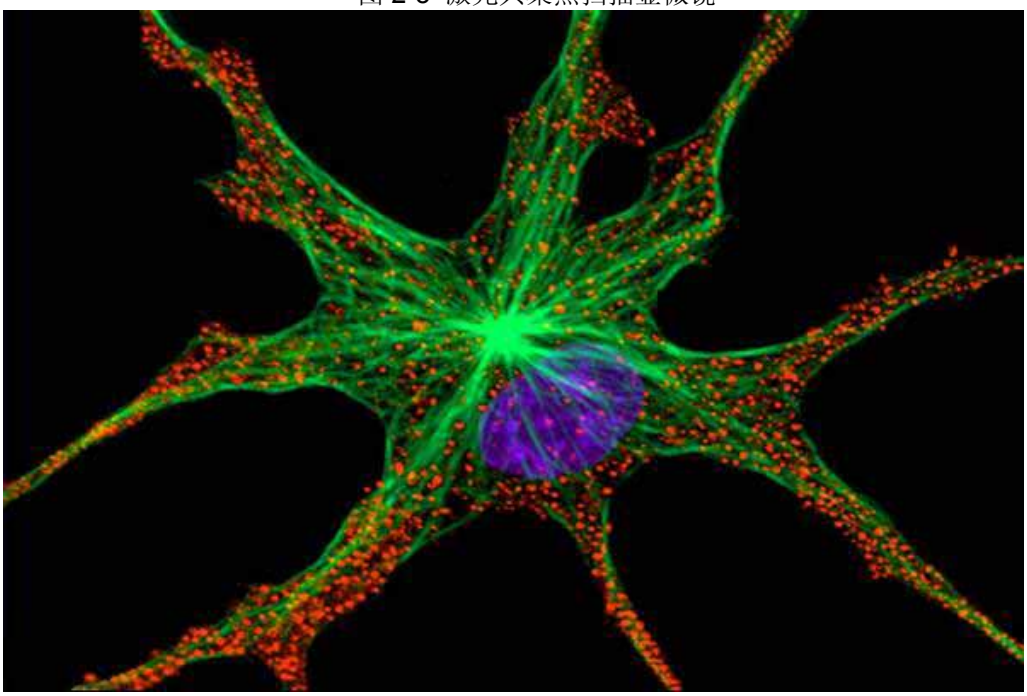


图 2-6 LCSM 照片，蓝色为细胞核，绿色为微管，图片来自 http://www.itg.uiuc.edu

激光共聚焦扫描显微镜（laser confocal scanning microscope，图 2-5、6）用激光作扫描光源，逐点、逐行、逐面快速扫描成像，扫描的激光与荧光收集共用一个物镜，物镜的焦点即扫描激光的聚焦点，也是瞬时成像的物点。由于激光束的波长较短，光束很细，所以共焦激光扫描显微镜有较高的分辨力，大约是普通光学显微镜的 3 倍。系统经一次调焦，扫描限制在样品的一个平面内。调焦深度不一样时，就可以获得样品不同深度层次的图像，这些图像信息都储于计算机内，通过计算机

分析和模拟，就能显示细胞样品的立体结构。

激光共聚焦扫描显微镜既可以用于观察细胞形态，也可以用于细胞内生化成分的定量分析、光密度统计以及细胞形态的测量。

（四）、暗视野显微镜

暗视野显微镜（dark field microscope，图 2-7）的聚光镜中央有当光片，使照明光线不直接进人物镜，只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜，因而视野的背景是黑的，物体的边缘是亮的。利用这种显微镜能见到小至 4~200nm 的微粒子，分辨率可比普通显微镜高 50 倍。

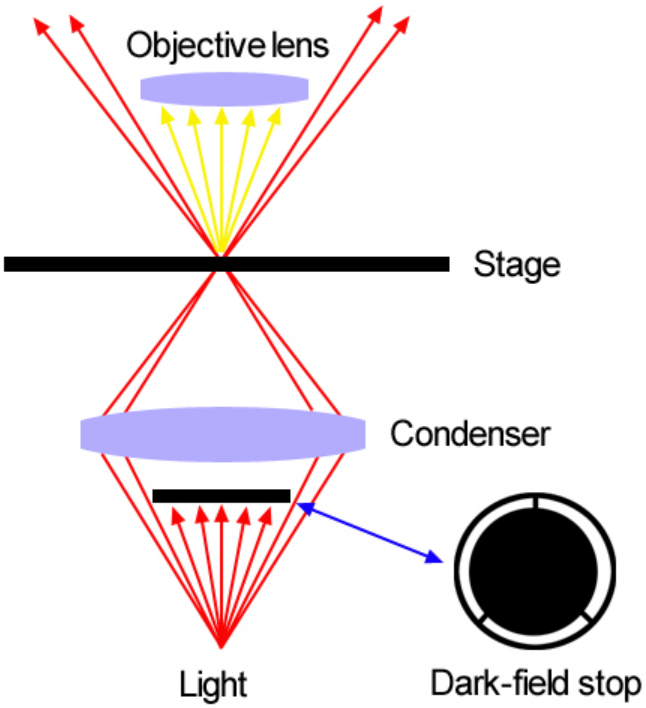


图 2-7 暗视野照明方式

（五）、相差显微镜

相差显微镜（phasecontrast microscope，图 2-8、9）由 P．Zernike 于 1932 年发明，并因此获 1953 年诺贝尔物理奖。这种显微镜最大的特点是可以观察未经染色的标本和活细胞。

相差显微镜的基本原理是，把透过标本的可见光的光程差变成振幅差，从而提高了各种结构间的对比度，使各种结构变得清晰可见。光线透过标本后发生折射，偏离了原来的光路，同时被延迟了 1/4λ（波长），如果再增加或减少 1/4λ，则光程差变为 1/2λ，两束光合轴后干涉加强，振幅增大或减下，提高反差。在构造上，相

差显微镜有不同于普通光学显微镜两个特殊之处：

1. 环形光阑（annular diaphragm） 位于光源与聚光器之间，作用是使透过聚光器的光线形成空心光锥，焦聚到标本上。
2. 相位板（annular phaseplate）在物镜中加了涂有氟化镁的相位板，可将直射光或衍射光的相位推迟 1/4λ。分为两种：
   1. A^+相板：将直射光推迟 1/4λ，两组光波合轴后光波相加，振幅加大，标本结构比周围介质更加变亮，形成亮反差（或称负反差）。
   2. B^+相板：将衍射光推迟 1/4λ，两组光线合轴后光波相减，振幅变小，形成暗反差（或称正反差），结构比周围介质更加变暗。

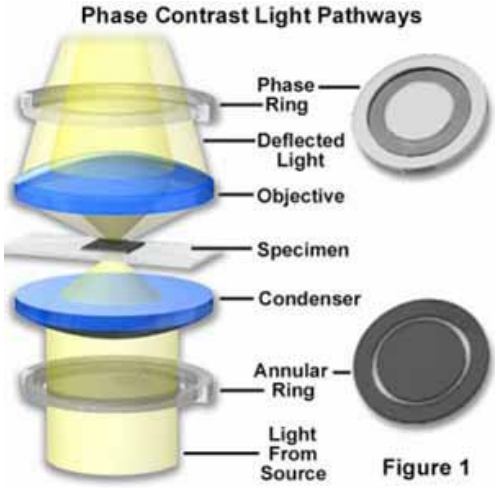


图 2-8 相差显微镜照明原理

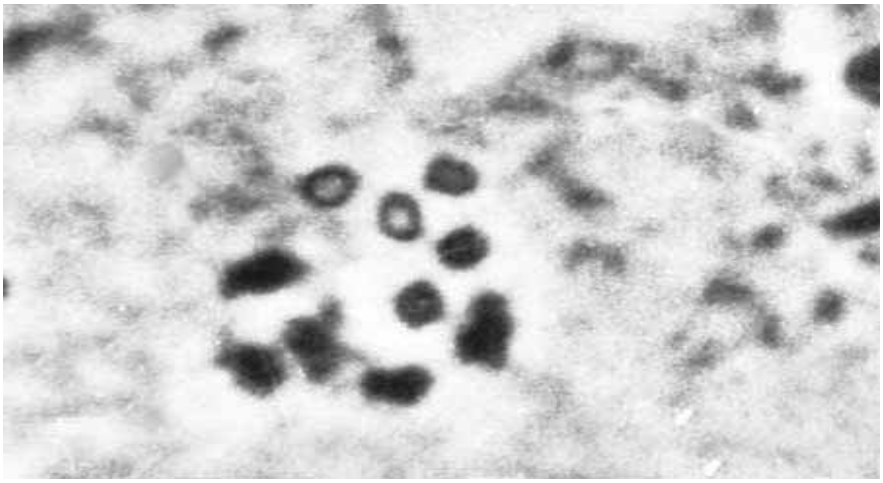


图 2-9 一种介壳虫的染色体（PCM 照片）

（六）、偏光显微镜

偏光显微镜（polarizing microscope）用于检测具有双折射性的物质，如纤维丝、纺锤体、胶原、染色体等等。和普通显微镜不同的是：其光源前有偏振片（起偏器），使进入显微镜的光线为偏振光，镜筒中有检偏器（一个偏振方向与起偏器垂直的的起偏器），这种显微镜的载物台是可以旋转的，当载物台上放入单折射的物质时，无论如何旋转载物台，由于两个偏振片是垂直的，显微镜里看不到光线，而放入双折射性物质时，由于光线通过这类物质时发生偏转，因此旋转载物台便能检测到这种物体。

（七）、微分干涉差显微镜

1952 年，Nomarski 在相差显微镜原理的基础上发明了微分干涉差显微镜（differential interference contrast microscope）。DIC 显微镜又称 Nomarski 相差显微镜（Nomarki contrast microscope），其优点是能显示结构的三维立体投影影像。与相差显微镜相比，其标本可略厚一点，折射率差别更大，故影像的立体感更强。

DIC 显微镜的物理原理完全不同于相差显微镜，技术设计要复杂得多。DIC 利用的是偏振光，有四个特殊的光学组件：偏振器（polarizer）、DIC 棱镜、DIC 滑行器和检偏器（analyzer）。偏振器直接装在聚光系统的前面，使光线发生线性偏振。在聚光器中则安装了石英 Wollaston 棱镜，即 DIC 棱镜，此棱镜可将一束光分解成偏振方向不同的两束光（x 和 y），二者成一小夹角。聚光器将两束光调整成与显微镜光轴平行的方向。最初两束光相位一致，在穿过标本相邻的区域后，由于标本的厚度和折射率不同，引起了两束光发生了光程差。在物镜的后焦面处安装了第二个 Wollaston 棱镜，即 DIC 滑行器，它把两束光波合并成一束。这时两束光的偏振面（x 和 y）仍然存在。最后光束穿过第二个偏振装置，即检偏器。在光束形成目镜 DIC 影像之前，检偏器与偏光器的方向成直角。检偏器将两束垂直的光波组合成具有相同偏振面的两束光，从而使二者发生干涉。x 和 y 波的光程差决定着透光的多少。光程差值为 0 时，没有光穿过检偏器；光程差值等于波长一半时，穿过的光达到最大值。于是在灰色的背景上，标本结构呈现出亮暗差。为了使影像的反差达到最佳状态，可通过调节 DIC 滑行器的纵行微调来改变光程差，光程差可改变影像的亮度。调节 DIC 滑行器可使标本的细微结构呈现出正或负的投影形象，通常是一侧亮，而另一侧暗，这便造成了标本的人为三维立体感，类似大理石上的浮雕（图 2-10）。

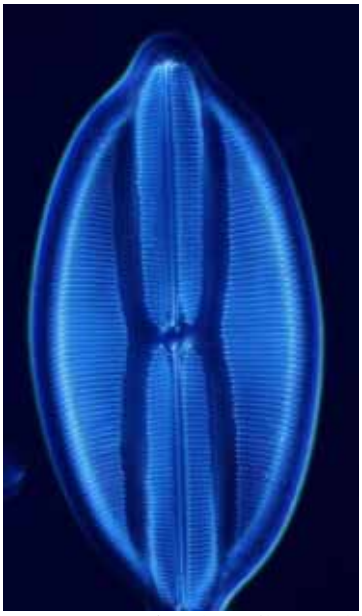


图 2-10 DIC 显微镜下的硅藻（伪彩色）

DIC 显微镜使细胞的结构，特别是一些较大的细胞器，如核、线粒体等，立体感特别强，适合于显微操作。目前像基因注入、核移植、转基因等的显微操作常在这种显微镜下进行。

（八）、倒置显微镜

组成和普通显微镜一样，只不过物镜与照明系统颠倒，前者在载物台之下，后者在载物台之上（图 2-11），用于观察培养的活细胞，具有相差物镜。

图 2-11 莱卡倒置显微镜

进入 20 世纪 80 年代以来，光学显微镜的设计和制作又有了很大的发展，其发展趋势主要表现在，注重实用性和多功能方面的改进。在装配设计上趋于采用组合方式，集普通光镜加相差、荧光、暗视野、DIC、摄影装置于一体，从而操作灵活，使用方便。

二、电子显微镜

（一）、透射电子显微镜

1、基本原理

在光学显微镜下无法看清小于 0.2μm 的细微结构，这些结构称为亚显微结构（submicroscopic structures）或超微结构（ultramicroscopic structures；ultrastructures）。要想看清这些结构，就必须选择波长更短的光源，以提高显微镜的分辨率。1932 年 Ruska 发明了以电子束为光源的透射电子显微镜（transmission electron microscope，TEM），电子束的波长要比可见光和紫外光短得多，并且电子束的波长与发射电子束的电压平方根成反比，也就是说电压越高波长越短。目前 TEM 的分辨力可达 0.2nm。

电子显微镜（图 2-12）与光学显微镜的成像原理基本一样，所不同的是前者用电子束作光源，用电磁场作透镜。另外，由于电子束的穿透力很弱，因此用于电镜的标本须制成厚度约 50nm 左右的超薄切片。这种切片需要用超薄切片机（ultramicrotome）制作。电子显微镜的放大倍数最高可达近百万倍、由电子照明系统、电磁透镜成像系统、真空系统、记录系统、电源系统等 5 部分构成。

表 2-2 不同光源的波长

名　　称	可见光	紫外光	X 射线	α 射线	电子束	
					0.1Kv	10Kv
波长（nm）	390~760	13~390	0.05~13	0.005~1	0.123	0.0122

2、制样技术

1）超薄切片

通常以锇酸和戊二醛固定样品，以环氧树脂包埋，以热膨胀或螺旋推进的方式推进样品切片（图 2-13），切片厚度 20~50nm，切片采用重金属盐染色，以增大反差（图 2-14）。

图 2-12 JEM-1011 透射电子显微镜

图 2-13 莱卡超薄切片机

图 2-14 内质网透射电镜图（伪彩色）

2）负染技术

负染就是用重金属盐（如磷钨酸、醋酸双氧铀）对铺展在载网上的样品进行染色；吸去染料，样品干燥后，样品凹陷处铺了一薄层重金属盐，而凸的出地方则没有染料沉积，从而出现负染效果（图 2-15），分辨力可达 1.5nm 左右。

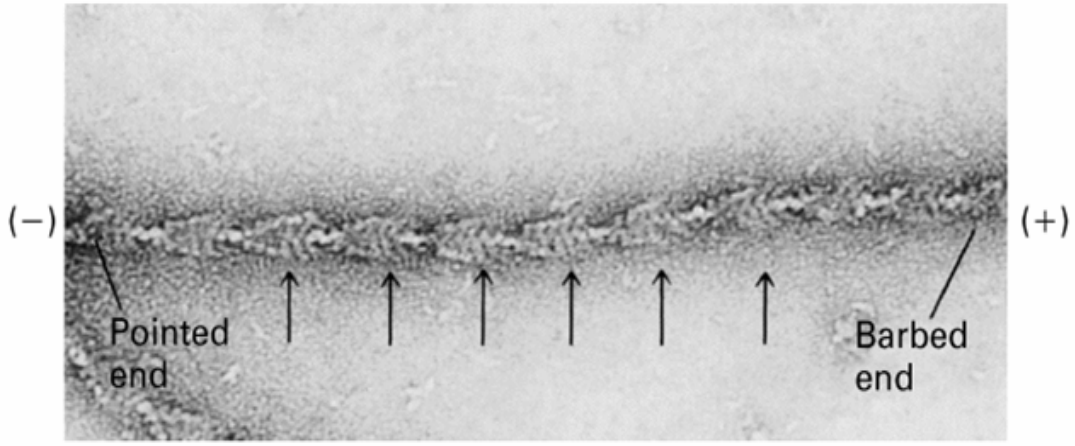


图 2-15 肌动蛋白纤维的负染电镜照片

3）冰冻蚀刻

冰冻蚀刻（freeze-etching）亦称冰冻断裂（freeze-fracture）。标本置于-100˚C的干冰或-196˚C 的液氮中，进行冰冻。然后用冷刀骤然将标本断开，升温后，冰在真空条件下迅即升华，暴露出断面结构，称为蚀刻（etching）。蚀刻后，向断面以45 度角喷涂一层蒸汽铂，再以 90 度角喷涂一层碳，加强反差和强度。然后用次氯酸钠溶液消化样品，把碳和铂的膜剥下来，此膜即为复膜（replica）。复膜显示出了标本蚀刻面的形态，在电镜下得到的影像即代表标本中细胞断裂面处的结构（图2-16）。

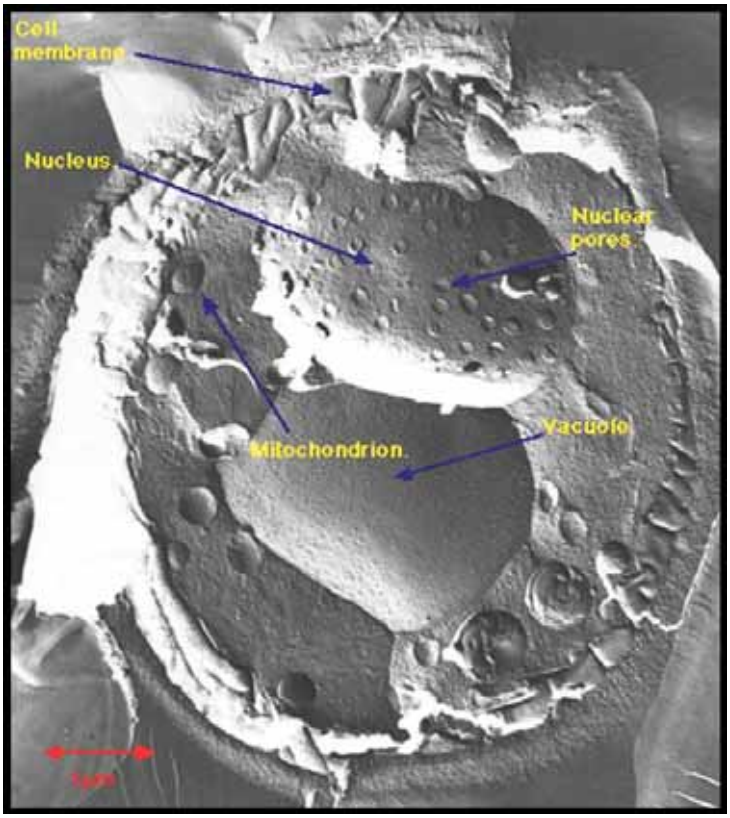


图 2-16 冰冻蚀刻电镜照片

（二）、扫描电子显微镜

扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM，图 2-17、18、19）于 20 世纪 60 年代问世，用来观察标本的表面结构。其工作原理是用一束极细的电子束扫描样品，在样品表面激发出次级电子，次级电子的多少与电子束入射角有关，也就是说与样品的表面结构有关，次级电子由探测体收集，并在那里被闪烁器转变为光信号，再经光电倍增管和放大器转变为电信号来控制荧光屏上电子束的强度，显示出与电子束同步的扫描图像。图像为立体形象，反映了标本的表面结构。为了使标本表面发射出次级电子，标本在固定、脱水后，要喷涂上一层重金属微粒，重金属在电子束的轰击下发出次级电子信号。

目前扫描电镜的分辨力为 6~10nm，人眼能够区别荧光屏上两个相距 0.2mm 的光点，则扫描电镜的最大有效放大倍率为 0.2mm/10nm=20000X。

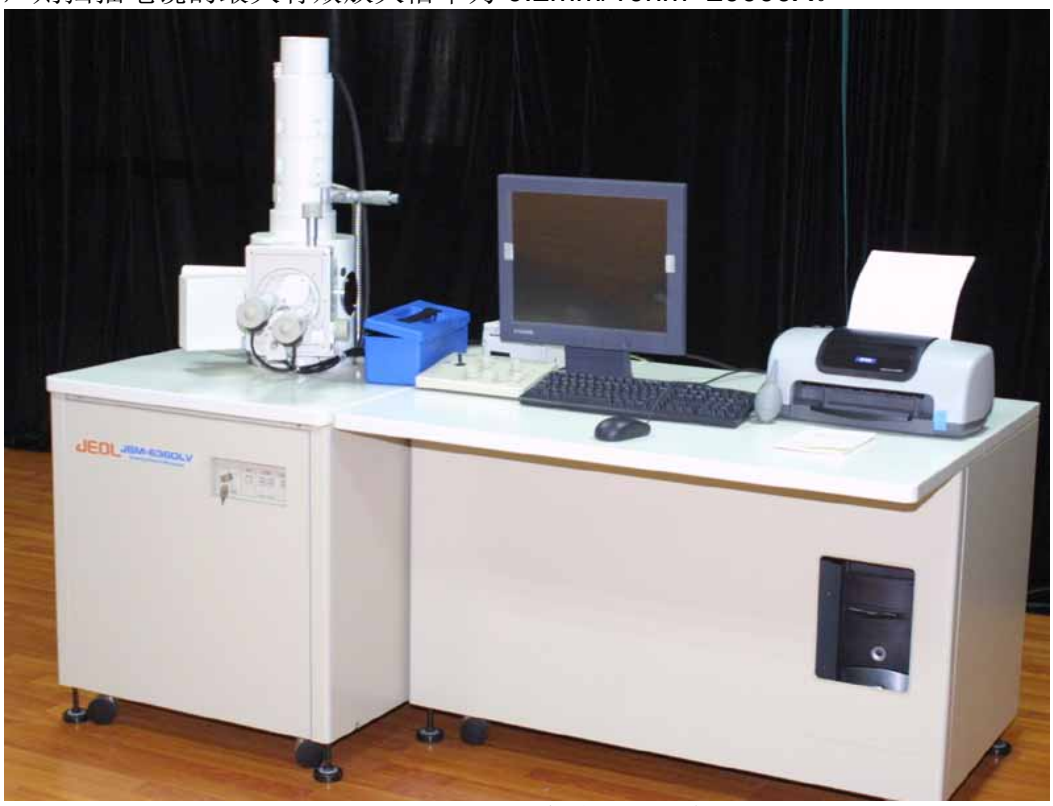


图 2-17 JEOL 扫描电子显微镜

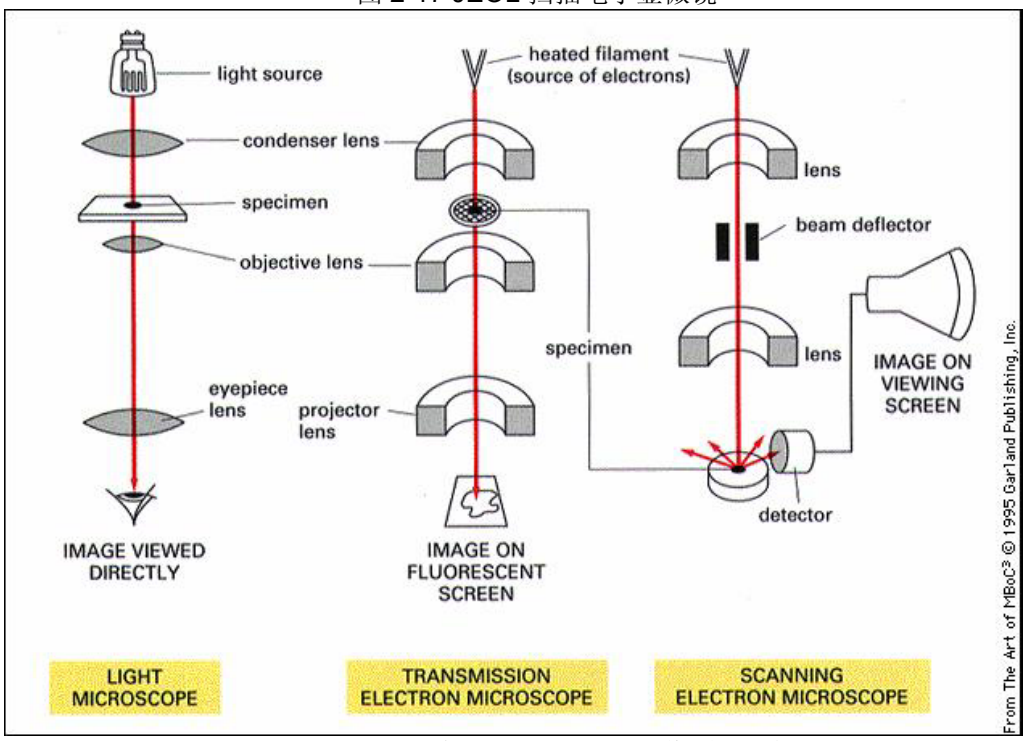


图 2-18 光学显微镜、TEM、SEM 成像原理比较

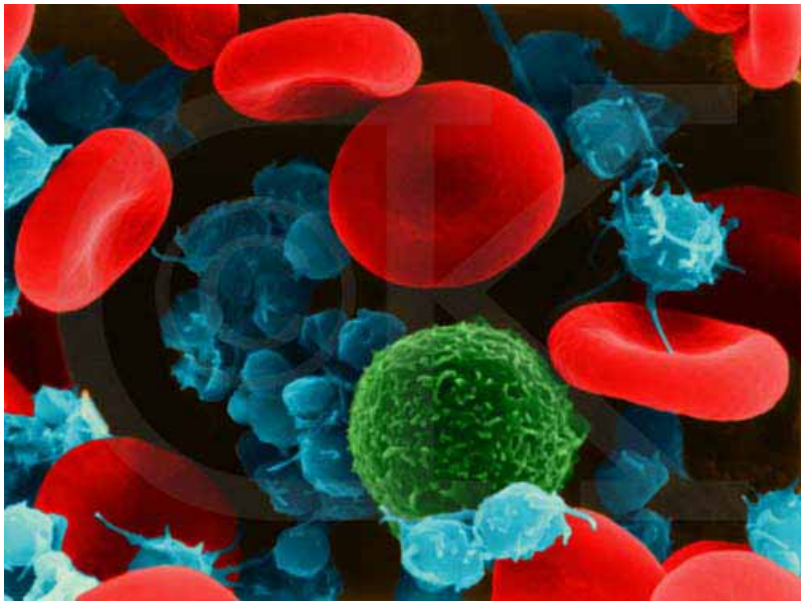


图 2-19 人类血细胞 SEM 照片
图片来自 http://www.denniskunkel.com/

（三）、扫描隧道显微镜

扫描隧道显微镜（scanning tunneling microscope，STM） 由 Binnig 等 1981 年发明，根据量子力学原理中的隧道效应而设计。当原子尺度的针尖在不到一个纳米的高度上扫描样品时，此处电子云重叠，外加一电压（2mV~2V），针尖与样品之间产生隧道效应而有电子逸出，形成隧道电流。电流强度和针尖与样品间的距离有函数关系，当探针沿物质表面按给定高度扫描时，因样品表面原子凹凸不平，使探针与物质表面间的距离不断发生改变，从而引起电流不断发生改变。将电流的这种改变图像化即可显示出原子水平的凹凸形态。扫描隧道显微镜的分辨率很高，横向为 0.1~0.2nm，纵向可达 0.001nm。它的优点是三态（固态、液态和气态）物质均可进行观察，而普通电镜只能观察制作好的固体标本。

利用扫描隧道显微镜直接观察生物大分子，如 DNA、RNA 和蛋白质等分子的原子布阵，和某些生物结构，如生物膜、细胞壁等的原子排列。

三、显微操作技术

显微操作技术（micromanipulation technique）是指在高倍复式显微镜下，利用显微操作器（micromanipulator，图 2-20）进行细胞或早期胚胎操作的一种方法。显微操作器是用以控制显微注射针在显微镜视野内移动的机械装置。

显微操作技术包括细胞核移植、显微注射、嵌合体技术、胚胎移植以及显微切割等。细胞核移植技术已有几十年的历史，Gordon 等人（1962）对非洲爪蟾进行核移植获得成功。我国著名学者童第周等在鱼类细胞核移植方面进行了许多工作，

并取得了丰硕成果。

图 2-20 尼康 NT-88NE 显微操作/注射仪 （图片来自 http://www.nikon.com）

第二节 生物化学与分子生物学技术

现代细胞生物学发展是靠形态观察结合生物化学和分子生物学研究来推动的，没有这些相关学科的发展也就没有现代细胞生物学。

一、细胞化学技术

组织化学或细胞化学染色（histochemical or cytochemical staining）是利用染色剂可同细胞的某种成分发生反应而着色的原理，对某种成分进行定性或定位研究的技术。利用这种方法对细胞的各种成分几乎都能显示，包括有无机物、醛、蛋白质、糖类、脂类、核酸、酶等。

（一）、固定

目的是将细胞的结构和化学物质双重地保存下来，固定细胞的方法有：

1. 物理固定：如血膜空气快速干燥、冷冻干燥或直接冷冻切片。
2. 化学固定：如甲醇、乙醇、丙酮、甲醛、戊二醛和锇酸等试剂均能对细胞结构

和其中的某些化学物质加以固定保存。不同化学试剂所保存的化学成分、对酶活性的影响、保存结构的细腻度均不相同。因此，要根据实验要求和组化反应，选择最佳的固定方法和固定剂。如显示多糖常用乙醇固定，而显示酶类多用甲醛丙酮缓冲液固定。

（二）、显示方法

1. 金属沉淀法：利用金属化合物在反应过程中生成有色沉淀，借以辨认所检查的物质或酶活性。如磷酸酶分解磷酸酯底物后，反应产物最终生成 CoS 或 PbS 有色沉淀，而显示出酶活性。
2. 偶氮偶联法：酚类化合物与偶氮染料结合后可以形成耐晒染料。
3. Schiff 反应：细胞中的醛基可使 Schiff 试剂中的无色品红变为红色。这种反应通常用于显示糖和脱氧核糖核酸（Feulgen 反应）。
4. 联苯胺反应：过氧化氢酶分解 H_20_2。产生新生氧，后者再将无色的联苯胺氧化成联苯胺蓝，进而变成棕色化合物。
5. 普鲁士蓝反应：三价铁与酸性亚铁氰化钾作用，形成普鲁士蓝。
6. Formazane 反应：显示脱氢酶。
7. “Nadi”反应：显示细胞色素氧化酶。
8. 脂溶染色法：借苏丹染料溶于脂类而使脂类显色。
9. 茚三酮反应：显示蛋白质。

二、免疫细胞化学

免疫细胞化学（immunocytochemistry）是根据免疫学原理，利用抗体同特定抗原专一结合，对抗原进行定位测定的技术。抗原主要为大分子或与大分子相结合的小分子；抗体则是由浆细胞针对特定的抗原分泌的 γ 球蛋白。如果将抗体结合上标记物，再与组织中的抗原发生反应，即可在光镜或电镜下显示出该抗原存在于组织中的部位。

常用的标记物有荧光素和酶。荧光素标记的称为免疫荧光法（immunofluorescent technique）常用的萤光素有异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate）、罗丹明（rhodamine）等。酶标记的称为酶标免疫法（enzyme-labeled antibody method），常用的酶有辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase），酶与底物发生反应后形成不透明的沉积物，从而显示出抗原存在的部位。

抗体与抗原的结合方法可分为直接法和间接法两种，直接法是将带有标记的抗体与抗原反应，显示出抗原存在的部位。而间接法则是在抗体抗原初级反应的基础上，再用带标记的次级抗体同初级抗体反应，从而使初级反应得到放大，显示增强。

三、显微光谱分析技术

细胞中有一些成分具有特定的吸收光谱，核酸、蛋白质、细胞色素、维生素等都有自己特征性的吸收曲线。例如，核酸的吸收波长为 260nm，而蛋白质的则为280nm。有的成分经组织化学染色后，对可见光有特定的吸收光谱。根据细胞成分所具有的这种特性，可利用显微分光光度计对某些成分进行定位、定性，甚至定量测定。

四、放射自显影术

放射自显影术（radioautography；autoradiography）用于研究标记化合物在机体、组织和细胞中的分布、定位、排出以及合成、更新、作用机理、作用部位等等。其原理是将放射性同位素（如 ^{14}C 和 ^{3}H）标记的化合物导入生物体内，经过一段时间后，将标本制成切片或涂片，涂上卤化银乳胶，经一定时间的放射性曝光，组织中的放射性即可使乳胶感光。然后经过显影、定影处理显示还原的黑色银颗粒，即可得知标本中标记物的准确位置和数量，放射自显影的切片还可再用染料染色，这样便可在显微镜下对标记上放射性的化合物进行定位或相对定量测定。

这种技术与电镜样品处理，则为电镜放射自显影。

由于有机大分子均含有碳、氢原子，故实验室一般常选用 ^{14}C 和 ^{3}H 标记。^{14}C 和 ^{3}H 均为弱放射性同位素，半衰期长，^{14}C 为 5730 年，^{3}H 为 12.5 年。一般常用 ^{3}H 胸腺嘧啶脱氧核苷（^{3}H-TDR）来显示 DNA，用 ^{3}H 尿嘧啶核苷（^{3}H-UDR）显示 RNA；用 ^{3}H 氨基酸研究蛋白质，研究多糖则用 ^{3}H 甘露糖、^{3}H 岩藻糖等。

五、分子杂交技术

分子杂交技术（molecular hybridization）是在研究 DNA 分子复性变化基础上发展起来的一种技术。其原理是，具有互补核苷酸序列的两条单链核苷酸分子片段，在适当条件下，通过氢键结合，形成 DNA-DNA，DNA-RNA 或 RNA-RNA 杂交的双链分子。这种技术可用来测定单链分子核苷酸序列间是否具有互补关系。

（一）、原位杂交（*in situ* hybridization）。

用来检测染色体上的特殊 DNA 序列。最初是使用带放射性的 DNA 探针，通过放射自显影来显示位置。后来又发明了免疫探针法，将探针核苷酸的侧链加以改造，探针杂交后，其侧链可被带有荧光标记的抗体所识别，从而显示出位置（图 2-21）。

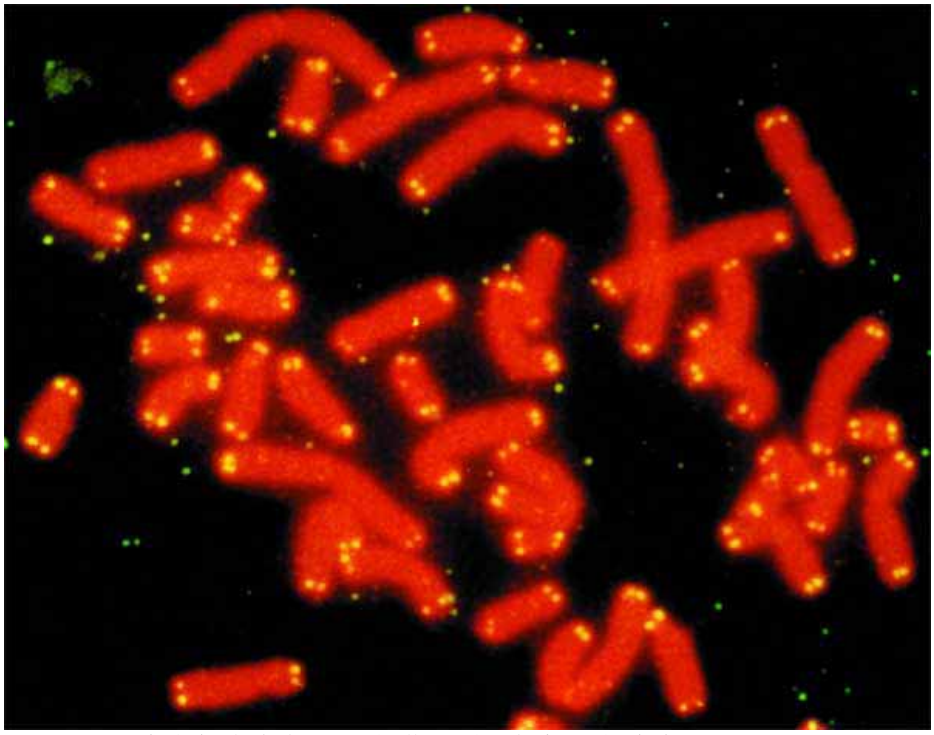


图 2-21 人类染色体端粒 DNA 的荧光原位杂交照片(来自 http://www.ornl.gov)

（二）、Southern 杂交

是体外分析特异 DNA 序列的方法，操作时先用限制性内切酶将核 DNA 或线粒体 DNA 切成 DNA 片段，经凝胶电泳分离后，转移到醋酸纤维薄膜上，再用标记的探针杂交，通过放射自显影，即可辨认出与探针互补的特殊核苷序列。

六、PCR 技术

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）用于在体外将微量的目标 DNA 大量扩增，以便进行分析。

反应体系：①样品 DNA；②引物（primer），是人工合成的一对寡核苷酸链（约 15-20 个核苷酸），用于扩增夹在双引物与模板 DNA 互补区之间的区域；③4 种 dNTP；④*Tag* DNA 聚合酶，是从一种嗜热水生菌（*Thermus aquaticus*）中分离出来的。此酶最适作用温度为 75~80℃，但短时间在 95℃下不失活。⑤适宜的缓冲体系和适量的 Mg^{2+}。

反应过程：①变性：将反应液置于 PCR 仪中，提高温度（约 90-95℃）使 DNA 双链解离；②复性：降温（约 60℃左右）退火，使引物与模板结合；③延伸：升温度至 70-75℃，在引物的引导下合成模板单链的互补链，从而形成 DNA 双链片段；④重复上述“变性——复性——延伸”的过程。最初几次循环中形成的长链 DNA 较多，但随着反应的进行，长链 DNA 以算术级数增加，而夹在两个引物之间的目

标 DNA 以指数级数增长，经大约 20—30 次循环后，扩增产物中主要是目标 DNA。

第三节 细胞分离技术

一、离心技术

离心是研究如细胞核、线粒体、高尔基体、溶酶体和微体，以及各种大分子基本手段。一般认为，转速为 10~25Kr/min 的离心机称为高速离心机；转速超过 25Kr/min，离心力大于 89K g 者称为超速离心机。目前超速离心机的最高转速可达 100Kr/min，离心力超过 500Kg。

（一）、差速离心（differential centrifugation）

在密度均一的介质中由低速到高速逐级离心，用于分离不同大小的细胞和细胞器（图 2-22）。

在差速离心中细胞器沉降的顺序依次为：核、线粒体、溶酶体与过氧化物酶体、内质网与高基体、最后为核蛋白体。

由于各种细胞器在大小和密度上相互重叠，而且某些慢沉降颗粒常常被快沉降颗粒裹到沉淀块中，一般重复 2～3 次效果会好一些。

差速离心只用于分离大小悬殊的细胞，更多用于分离细胞器。通过差速离心可将细胞器初步分离，常需进一步通过密度梯离心再行分离纯化。

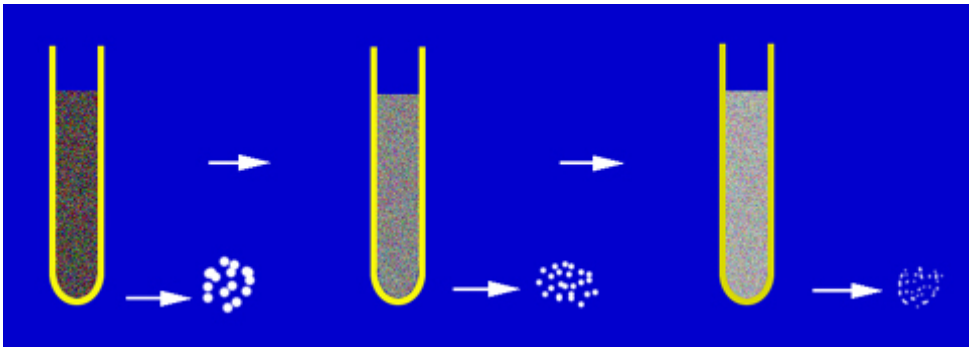


图 2-22 速度逐渐提高，样品按大小先后沉淀

（二）、密度梯度离心（density gradient centrifugation）

用一定的介质在离心管内形成一连续或不连续的密度梯度，将细胞混悬液或匀浆置于介质的顶部，通过重力或离心力场的作用使细胞分层、分离。这类分离又可分为速度沉降和等密度沉降平衡两种（图 2-23）。密度梯度离心常用的介质为氯化铯，蔗糖和多聚蔗糖。分离活细胞的介质要求：1）能产生密度梯度，且密度高时，

粘度不高；2）PH 中性或易调为中性；3）浓度大时渗透压不大；4）对细胞无毒。

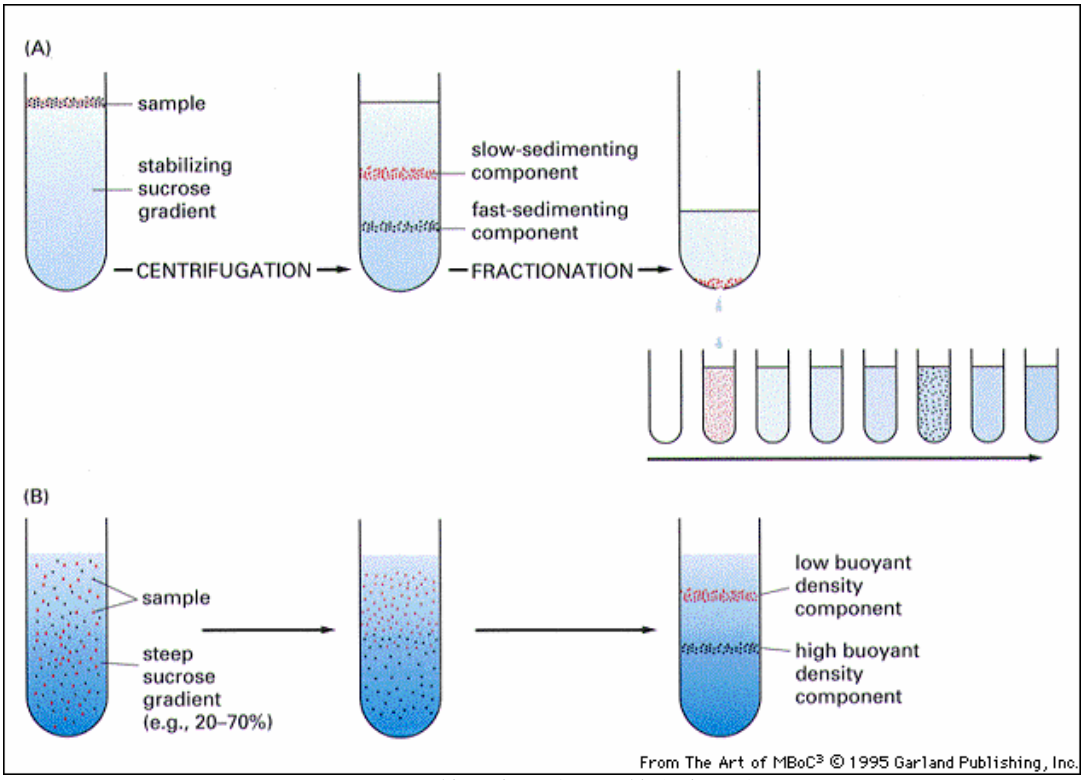


图 2-23　A 等速度沉降，B 等密度沉降

1、速度沉降

速度沉降（velocity sedimentation）主要用于分离密度相近而大小不等的细胞或细胞器。这种降方法所采用的介质密度较低，介质的最大密度应小于被分离生物颗粒的最小密度。

生物颗粒（细胞或细器）在十分平缓的密度梯度介质中按各自的沉降系数以不同的速度沉降而达到分离。

2、等密度沉降

等密度沉降（isopycnic sedimentation）适用于分离密度不等的颗粒。

细胞或细胞器在连续梯度的介质中经足够大离心力和是够长时间则沉降或漂浮到与自身密度相等的介质处，并停留在那里达到平衡，从而将不同密度的细胞或细胞器分离。

等密度沉降通常在较高密度的介质中进行。介质的最高密度应大于被分离组分的最大密度，而且介质的梯度要求较高的陡度，不能太平缓。再者，这种方法所需要的力场通常比速率沉降法大 10~100 倍，故往往需要高速或超速离心，离心时间也较长。大的离心力、长的离心时间都对细胞不利。大细胞比小细胞更易受高离心

力的损伤，而且停留在等密度介质中的细胞比处在移动中的细胞受到更大的损伤。因此，这种方法适于分离细胞器，而不太适于分离和纯化细胞。

二、流式细胞术

流式细胞术是对单个细胞进行快速定量分析与分选的一门技术。在分析或分选过程中，包在鞘液中的细胞通过高频振荡控制的喷嘴，形成包含单个细胞的液滴，在激光束的照射下，这些细胞发出散射光和荧光，经探测器检测，转换为电信号，送入计算机处理，输出统计结果，并可根据这些性质分选出高纯度的细胞亚群，分离纯度可达 99%（图 2-24）。包被细胞的液流称为鞘液，所用仪器称为流式细胞计（flow cytometer）。

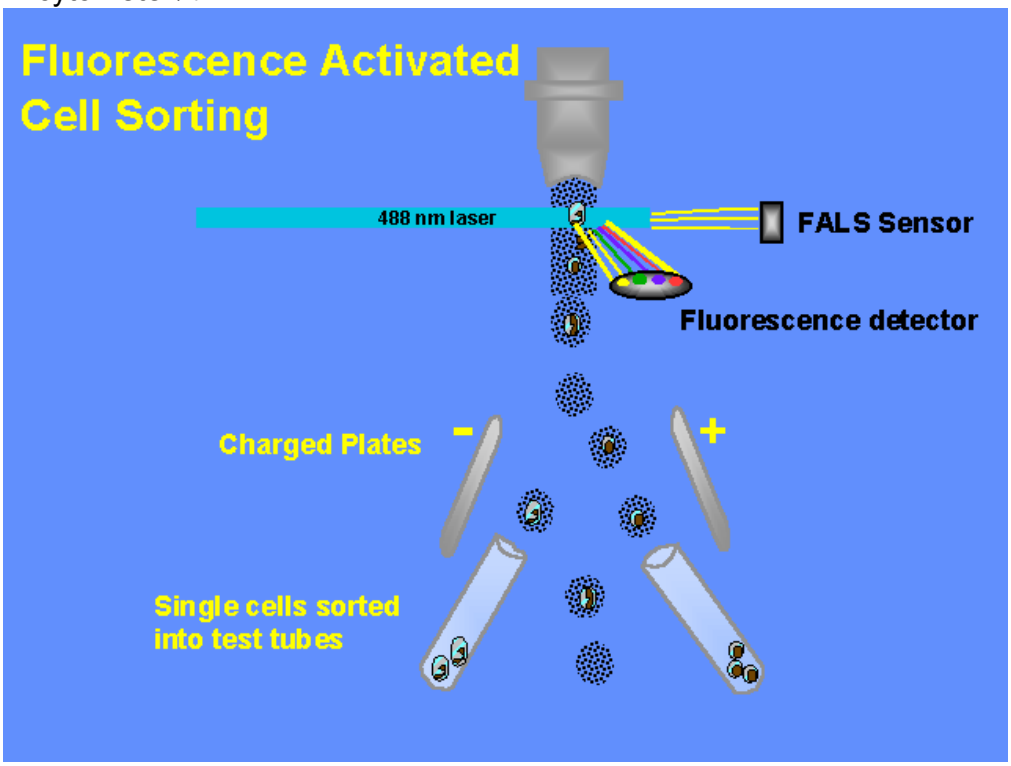


图 2-24 用流式细胞计分选细胞

三、细胞电泳

在一定 PH 值下细胞表面带有净的正或负电荷，能在外加电场的作用下发生泳动，这种现象称为细胞电泳（cell electrophoresis）。引起细胞电泳的电位值称为 ξ 电位。各种细胞或处于不同生理状态的同种细胞荷电量有所不同，故在一定的电场中的泳动速度不同。在恒定的电场条件下，同种细胞的电泳速度相当稳定，因而可通过测定电泳速度来推算出细胞的 ξ 电位。ξ 电位常因细胞生理状态和病理状态而异，因此在诊断疾病上有一定价值。此外由于不同类型的细胞在电场中的泳动速度

不同，细胞电泳尚可用来分离不同种类的细胞，例如可把淋巴样细胞与造血细胞分开。

第四节 细胞培养与细胞杂交

一、细胞培养

高等生物是由多细胞构成的整体，在整体条件下要研究单个细胞或某一群细胞在体内（*in vivo*）的功能活动是十分困难的。但是如果把活细胞拿到体外（*in vitro*）培养进行观察和研究，则要方便得多。活细胞离体后要在一定的生理条件下才能存活和进行生理活动，特别是高等动植物细胞要求的生存条件极其严格，稍有不适就要死亡。所以细胞培养技术（cell culture）就是选用最佳生存条件对活细胞进行培养和研究的技术。

动物细胞的生存环境与植物细胞差别很大，因而二者的培养方法很不相同。

（一）、动物细胞培养

细胞培养方式大致可分为两种（图 2-25）：一种是群体培养（mass culture），将含有一定数量细胞的悬液置于培养瓶中，让细胞贴壁生长，汇合（confluence）后形成均匀的单细胞层；另一种是克隆培养（clonal culture），将高度稀释的游离细胞悬液加入培养瓶中，各个细胞贴壁后，彼此距离较远，经过生长增殖每一个细胞形成一个细胞集落，称为克隆（clone）。一个细胞克隆中的所有细胞均来源于同一个祖先细胞。此外，为了制取细胞产品而设计了转鼓培养法，使用大容量的圆培养瓶，在培养过程中不断地转动，使培养的细胞始终处于悬浮状态之中而不贴壁。

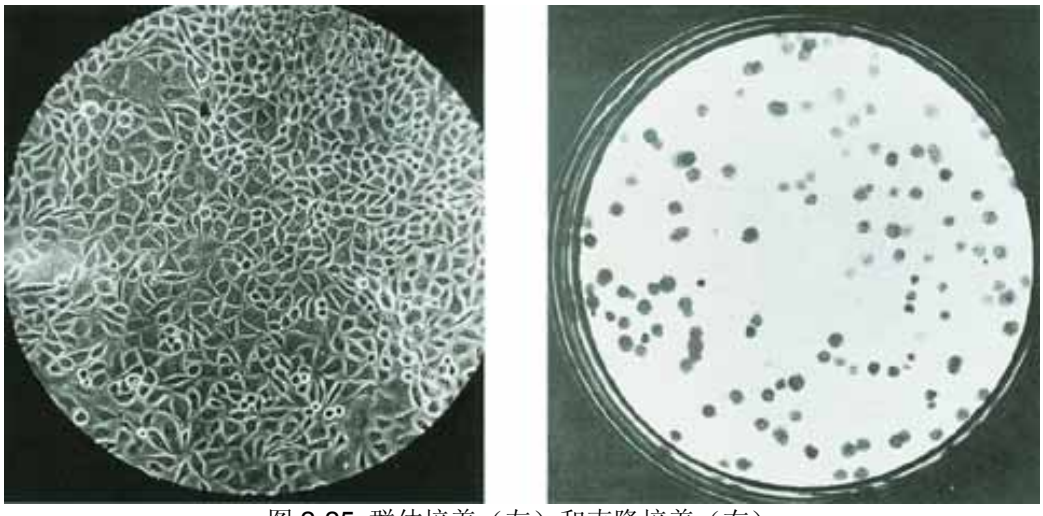


图 2-25 群体培养（左）和克隆培养（右）

表 2-3 目前实验室中常用的几种细胞系

细胞系名称	细胞类型	来源
3T3	成纤维细胞	小鼠
HeLa	宫颈癌上皮细胞	人
BHK21	成纤维细胞	叙利亚仓鼠
PtK1	上皮细胞	袋鼠
L6	成肌细胞	大鼠
PCI2	嗜铬细胞	大鼠
SP2	浆细胞	小鼠
SP2 / 0	骨髓瘤浆细胞	小鼠
CHO	卵巢细胞	中国地鼠

正常细胞培养的世代数有限，只有癌细胞和发生转化的细胞才能无限生长下去。所谓转化即是指正常细胞在某种因子的作用下发生突变而具有癌性的细胞。目前世界上许多实验室所广泛传用的 HeLa 细胞系就是 1951 年从一位名叫 Henrietta Lacks 的妇女身上取下的宫颈癌细胞培养而成。此细胞系一直延用至今。

1. 原代培养 （primary culture）：从动物机体取出的进行培养的细胞群。原代培养的细胞生长比较缓慢，而且繁殖一定的代数后（一般 10 代以内）停止生长，需要从更换培养基。将细胞从一个培养瓶转移到另外一个培养瓶即称为传代或传代培养（Passage）。
2. 细胞株（cell strain）：从原代培养细胞群中筛选出的具有特定性质或标志的细胞群，能够繁殖 50 代左右，在培养过程中其特征始终保持。
3. 细胞系（cell line）：从肿瘤组织培养建立的细胞群或培养过程中发生突变或转化的细胞，在培养条件下可无限繁殖
4. 克隆（clone）：亦称无性繁殖系或简称无性系。对细胞来说，克隆是指由同一个祖先细胞通过有丝分裂产生的遗传性状一致的细胞群。

（二）、植物细胞培养

植物细胞培养主要有如下几种技术：

1. 组织培养：诱发产生愈伤组织（图 2-26），如果条件适宜，可培养出再生植株。用于研究植物的生长发育、分化和遗传变异；进行无性繁殖；制取代谢产物。
2. 悬浮细胞培养：在愈伤组织培养技术基础上发展起来的一种培养技术。适合于进行产业化大规模细胞培养，制取植物代谢产物。
3. 原生质体培养：脱壁后的植物细胞称为原生质体（protoplast），其特点是：①比较容易摄取外来的遗传物质，如 DNA；②便于进行细胞融合，形成杂交细胞；③与完整细胞一样具有全能性，仍可产生细胞壁，经诱导分化成完整植株：
4. 单倍体培养：通过花药或花粉培养可获得单倍体植株，经人为加倍后可得到完全纯合的个体。

图 2-26 植物细胞培养

二、细胞融合

通过培养和诱导，两个或多个细胞合并成一个双核或多核细胞的过程称为细胞融合（cell fusion）或细胞杂交（cell hybridization）。

基因型相同的细胞融合成的杂交细胞称为同核体（homokaryon）；来自不同基因型的杂交细胞则称为异核体（heterokaryon）。

同种细胞在培养时 2 个靠在一起的细胞自发合并，称自发融合；异种间的细胞必须经诱导剂处理才能融合，称诱发融合。

诱导细胞融合的方法有三种：生物方法（病毒）、化学方法（聚乙二醇 PEG）、物理方法（电激和激光）。某些病毒如：仙台病毒、副流感病毒和新城鸡瘟病毒的被膜中有融合蛋白（fusion protein），可介导病毒同宿主细胞融合，也可介导细胞与细胞的融合，因此可以用紫外线灭活的此类病毒诱导细胞融合。化学和物理方法可造成膜脂分子排列的改变，去掉作用因素之后，质膜恢复原有的有序结构，在恢复过程中便可诱导相接触的细胞发生融合。

细胞融合不仅可用于基础研究，而且还有重要的应用价值，在植物育种方面已经成功的有萝卜+甘蓝、粉蓝烟草+郎氏烟草、番茄+马铃薯等等。

单克隆抗体技术是细胞杂交技术的成功应用（图 2-27），正常淋巴细胞（如小鼠脾细胞）具有分泌抗体的能力，但不能在体外长期培养，瘤细胞（如骨髓瘤）可以在体外长期培养，但不分泌抗体。于是英国人 Kohler 和 Milstein 1975 将两种细胞杂交而创立了单克隆抗体技术，获 1984 年诺贝尔奖。

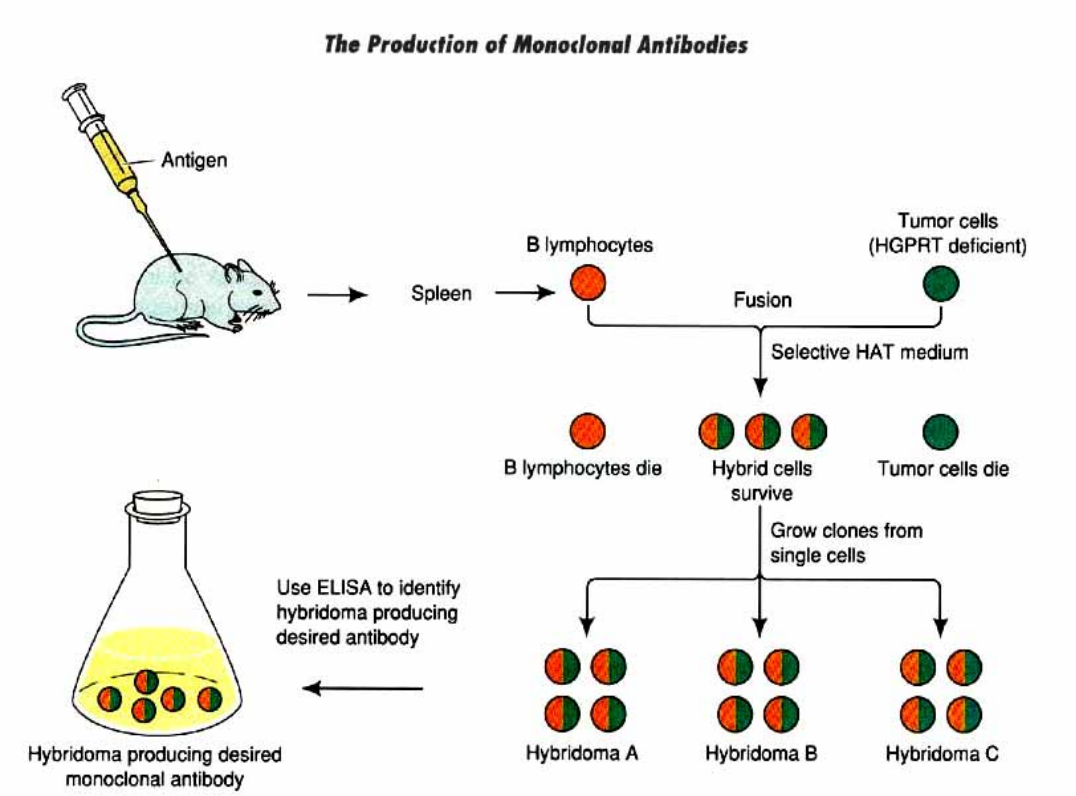


图 2-27 单克隆抗体技术

第三章 细胞生物学基础知识

细胞是一切生命活动的基本结构和功能单位。一般认为：

1. 细胞是由膜包围的原生质[6]（protoplasm）团，通过质膜与周围环境进行物质和信息交流；
2. 是构成有机体的基本单位，具有自我复制的能力，是有机体生长发育的基础；
3. 是代谢与功能的基本单位，具有一套完整的代谢和调节体系；
4. 是遗传的基本单位，具有发育的全能性。

第一节 真核细胞

一、质膜

细胞表面的一层单位膜，特称为质膜（plasmolemma；plasma membrane）。真核细胞除了具有质膜、核膜外，发达的细胞内膜形成了许多功能区隔。由膜围成的各种细胞器，如核膜、内质网、高尔基体、线粒体、叶绿体、溶酶体等。在结构上形成了一个连续的体系，称为内膜系统（endomembrane system）。内膜系统将细胞质分隔成不同的区域，即所谓的区隔化（compartmentalization）。区隔化是细胞的高等性状，它不仅使细胞内表面积增加了数十倍，各种生化反应能够有条不紊地进行，而且细胞代谢能力也比原核细胞大为提高。

二、细胞核

细胞核（nucleus）是细胞内最重要的细胞器，核表面是由双层膜构成的核被膜(nuclear envelope)，核内包含有由 DNA 和蛋白质构成的染色体(chromosome)。间期染色体结构疏松，称为染色质（chromatin）；有丝分裂过程中染色体凝缩变短，称为染色体。其实染色质与染色体只是同一物质在不同细胞周期的表现。染色体的数目因物种而异，有的如蕨类植物 *Ophioglossum reticulum* 的染色体数多达 1260 个；有的如马蛔虫 *Ascaris megalocephala* 只有两条染色体。核内 1 至数个小球形结构，称为核仁（nucleolus）。

[6] Purkinje（1839）用原生质一词指细胞的全部活性物质，从现代概念来说它包括质膜、细胞质和细胞核（或拟核）。

三、细胞质

存在于质膜与核被膜之间的原生质称为细胞质（cytoplasm），细胞之中具有可辨认形态和能够完成特定功能的结构叫做细胞器（organelles）。除细胞器外，细胞质的其余部分称为细胞质基质（cytoplasmic matrix）或胞质溶胶（cytosol），其体积约占细胞质的一半。细胞质基质并不是均一的溶胶结构，其中还含有由微管、微丝和中间纤维组成的细胞骨架结构。

（一）细胞质基质的功能：

1） 具有较大的缓冲容量，为细胞内各类生化反应的正常进行提供了相对稳定的离子环境。
2） 许多代谢过程是在细胞基质中完成的，如①蛋白质的合成、②核酸的合成、③脂肪酸合成、④糖酵解、⑤磷酸戊糖途径、⑥糖原代谢、⑦信号转导。
3） 供给细胞器行使其功能所需要的一切底物。
4） 细胞骨架参与维持细胞形态，做为细胞器和酶的附着点，并与细胞运动、物质运输和信号转导有关。
5） 控制基因的表达与细胞核一起参与细胞的分化，如卵母细胞中不同的 mRNA 定位于细胞质不同部位，卵裂是不均等的。
6） 参与蛋白质的合成、加工、运输、选择性降解。

（二）主要细胞器

1. 内质网（endoplasmic reticulum）：由膜围成一个连续的管道系统。；粗面内质网（rough endoplasmic reticulum，RER），表面附有核糖体，参与蛋白质的合成和加工；光面内质网（smooth endoplasmic reticulum，SER）表面没有核糖体，参与脂类合成。
2. 高尔基体（Golgi body；Golgi apparatus）：由成摞的扁囊和小泡组成，与细胞的分泌活动和溶酶体的形成有关。
3. 溶酶体（lysosome）：动物细胞中行细胞内消化作用的细胞器，含有多种酸性水解酶。
4. 线粒体（mitochondrion）：由双层膜围成的与能量代谢有关的细胞器，主要作用是通过氧化磷酸化合成 ATP。
5. 叶绿体（chloroplast）：植物细胞中与光合作用有关的细胞器，由双层膜围成。
6. 细胞骨架（cytoskeleton）：由微管、微丝和中间丝构成与细胞运动和维持细胞形态有关。
7. 中心粒（centriole）：位于动物细胞的中心部位，故名，由相互垂直的两组 9+0 三联微管组成。中心粒加中心粒周物质称为中心体（centrosome）。
8. 微体（microbody）：由单层单位膜围成的小泡状结构，含有多种氧化酶，与分

解过氧化氢和乙醛酸循环有关。

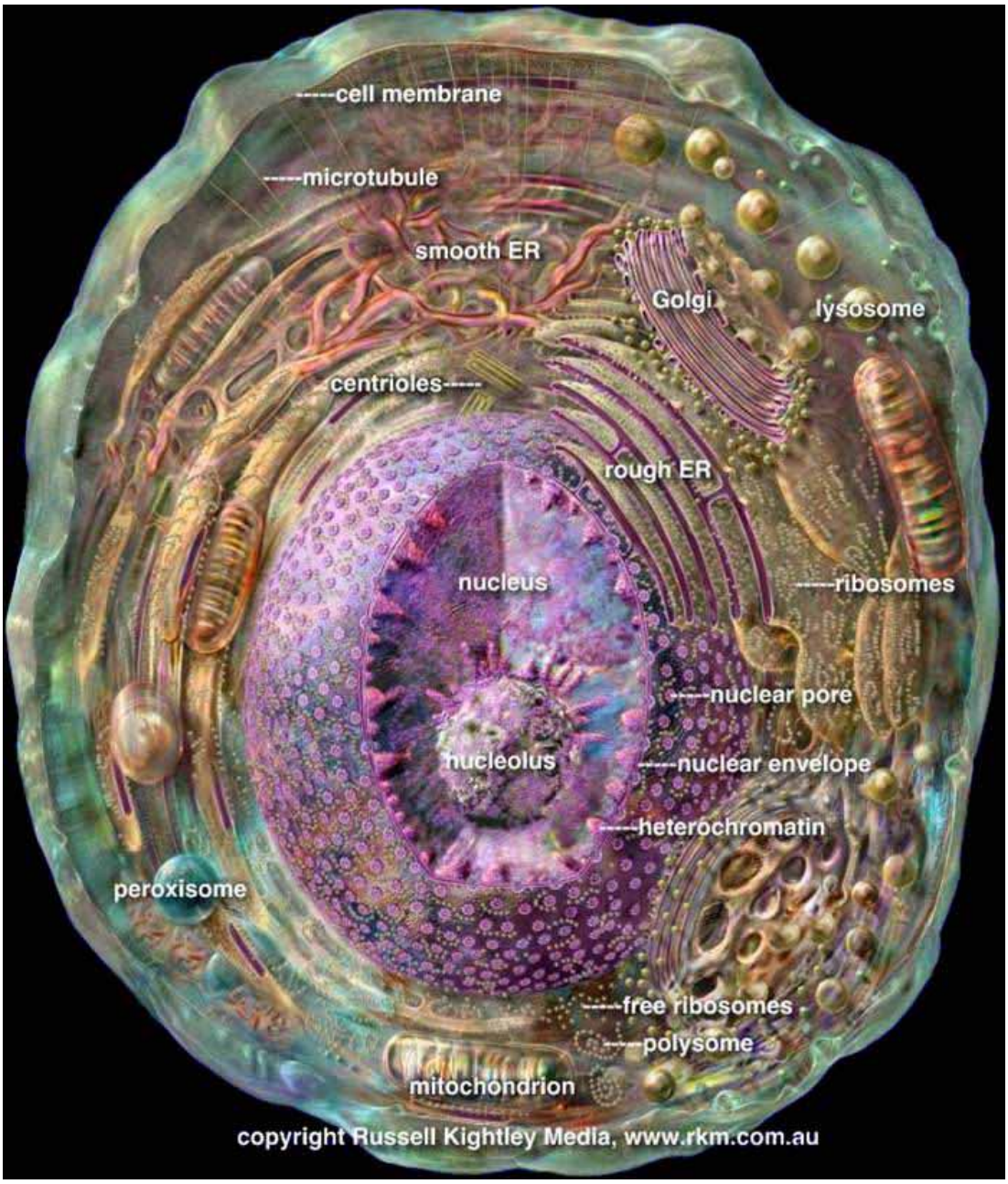


图 3-1 动物细胞的的结构 图片来自 http://www.rkm.com.au

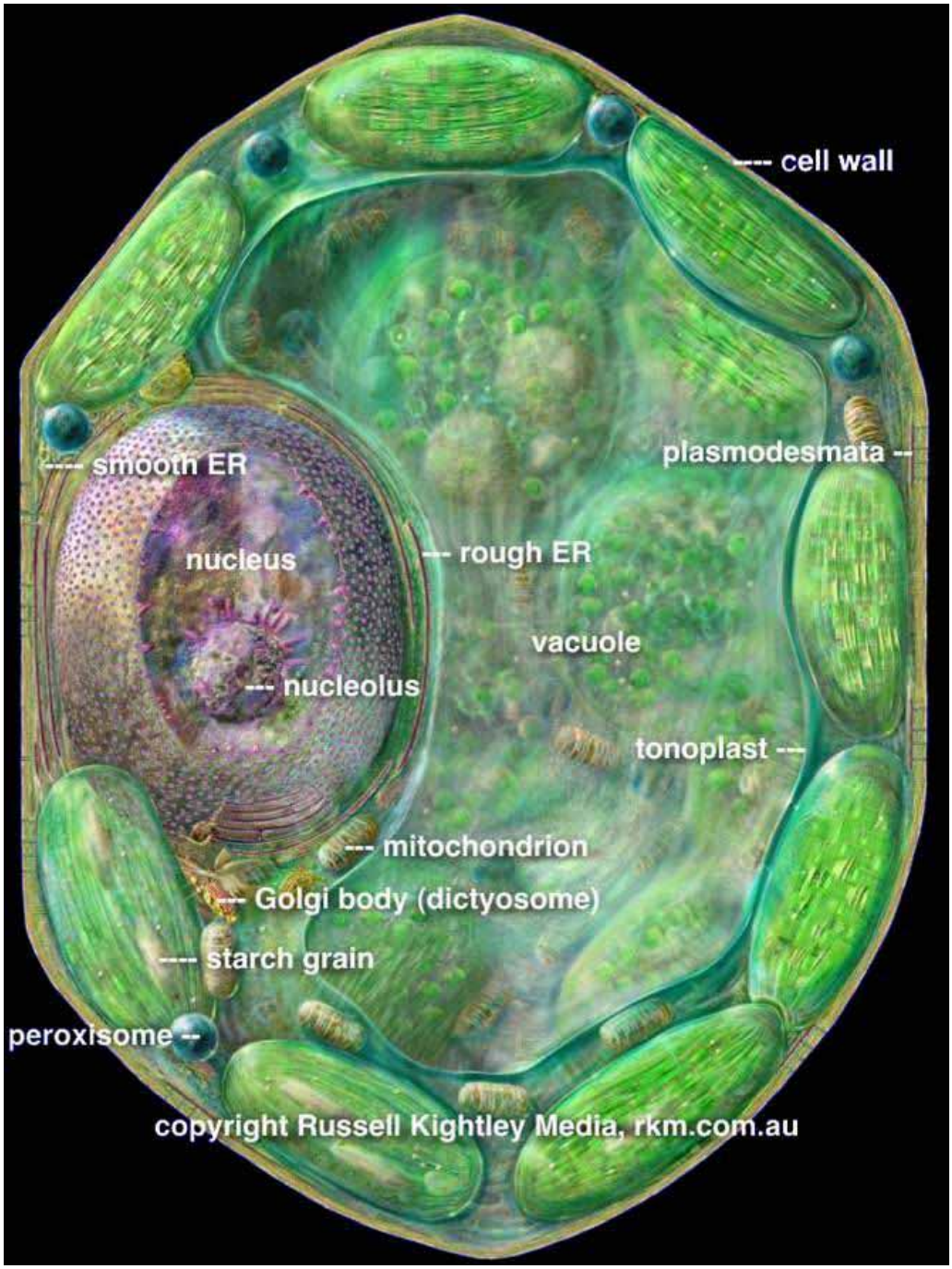


图 3-2 植物细胞的结构 图片来自 http://www.rkm.com.au

四、细胞的形状和大小

由于结构、功能和所处的环境不同，各类细胞形态千差万别，有圆形、椭圆形、柱形、方形、多角形、扁形、梭形，甚至不定形。

原核细胞的形状常与细胞外沉积物（如细胞壁）有关，如细菌细胞呈棒形，球形，弧形、螺旋形等不同形状。单细胞的动物或植物形状更复杂一些，如草履虫像鞋底状，眼虫呈梭形且带有长鞭毛，钟形虫呈袋状。

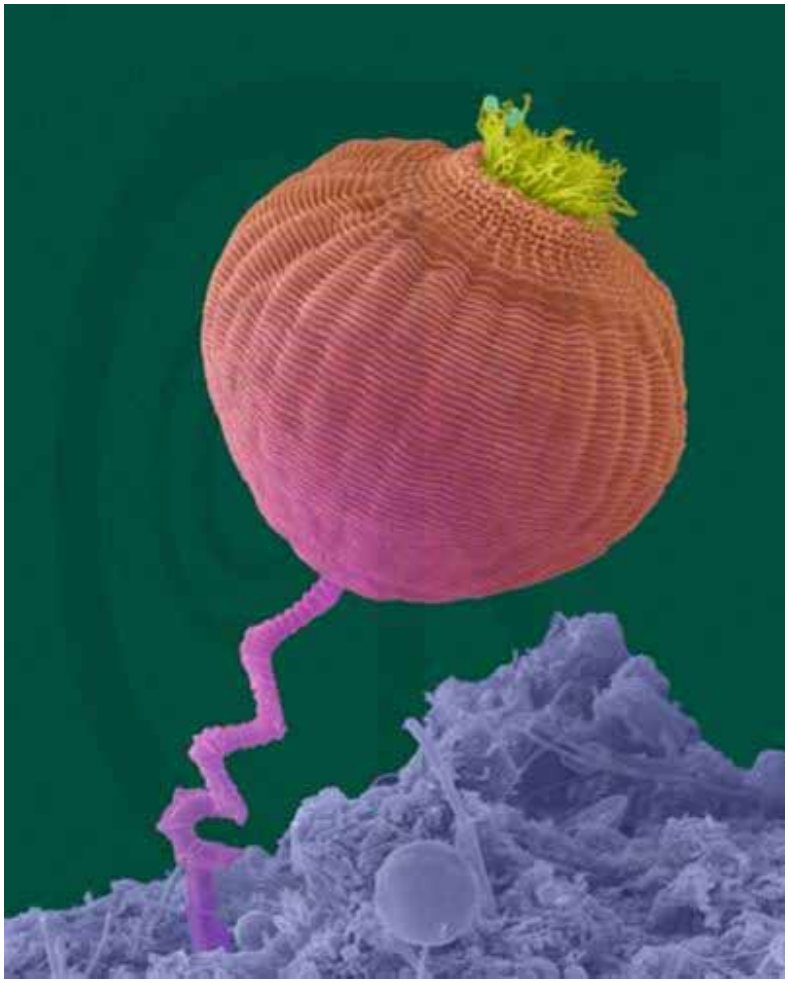


图 3-3 一种钟形虫（伪彩色） 图片来自 http://www.denniskunkel.com/

高等生物的细胞形状与细胞功能和细胞间的相互关系有关。如动物体内具有收缩功能的肌肉细胞呈长条形或长梭形；红细胞为圆盘状，有利于 O_2 和 CO_2 的气体交换。植物叶表皮的保卫细胞成半月形，2 个细胞围成一个气孔，以利于呼吸和蒸腾。细胞离开了有机体分散存在时，形状往往发生变化，如平滑肌细胞在体内成梭形，而在离体培养时则可成多角形。

图 3-4 植物气孔 SEM 照片（伪彩色） 图片来自 http://www.denniskunkel.com/

一般说来，真核细胞的体积大于原核细胞，卵细胞大于体细胞。大多数动植物细胞直径一般在 20~30μm 间。鸵鸟的卵黄直径可达 5cm，支原体仅 0.1μm，人的坐骨神经细胞可长达 1m。

表 3-1 几种细胞的大小

名称	人卵	口腔上皮细胞	肝细胞	红细胞	变形虫	伤寒菌	肺炎球菌
大小（μm）	120	75	20	7	100	2.4x0.5	0.2x0.1

第二节 原核细胞与古核细胞

原核细胞（prokaryotic cell）没有核膜，遗传物质集中在一个没有明确界限的低电子密度区（图 3-5），称为拟核（nucleoid）。DNA 为裸露的环状分子，通常没有结合蛋白，环的直径约为 2.5nm，周长约几十纳米。大多数原核生物没有恒定的内膜系统，核糖体为 70S 型，原核细胞构成的生物称为原核生物，均为单细胞生物。

一、细菌

细菌是在自然界分布最广、个体数量最多的有机体，是大自然物质循环的主要参与者。细菌主要由细胞壁、细胞膜、细胞质、核质体等部分构成，有的细菌还有夹膜、鞭毛、菌毛等特殊结构（图 3-6）。绝大多数细菌的直径大小在 0.5~5μm 之间。可根据形状分为三类，即：球菌（图 3-7）、杆菌（图 3-8）和螺旋菌（包括弧

形菌，图 3-9）。

图 3-5 大肠杆菌 TEM 照片，核区为低电子密度区

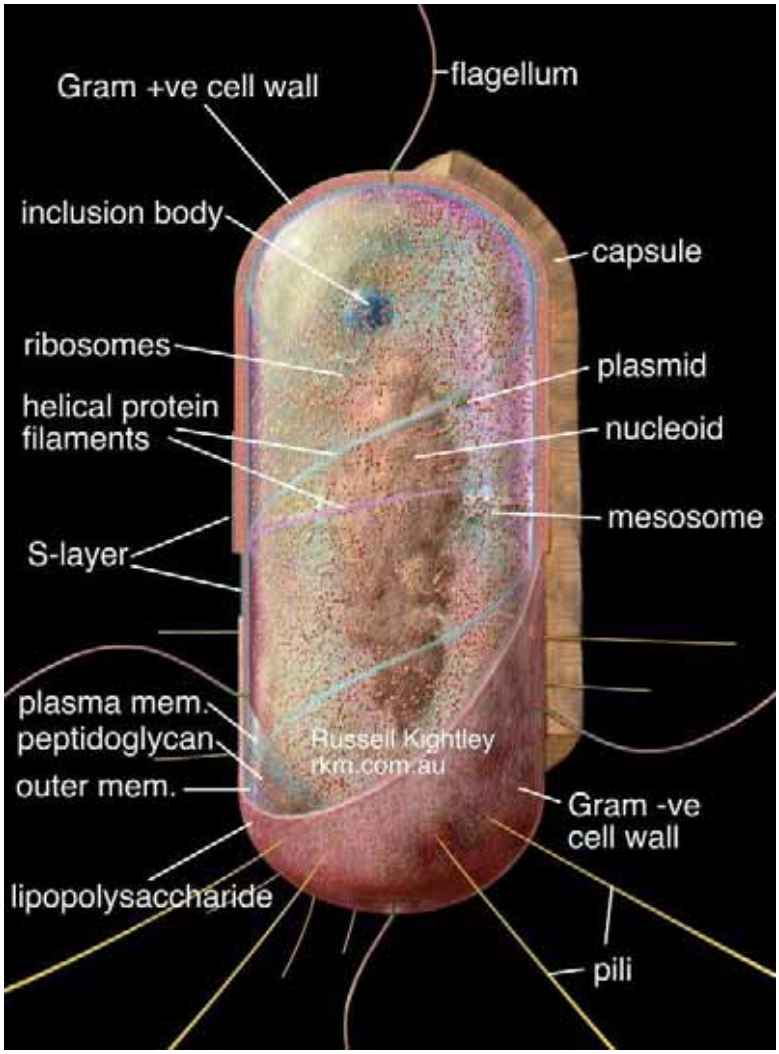


图 3-6 细菌的结构，图片来自 http://www.rkm.com.au

图 3-7 淋病球菌图片来自 http://www.denniskunkel.com/

图 3-8 大肠杆菌图片来自 http://www.denniskunkel.com/

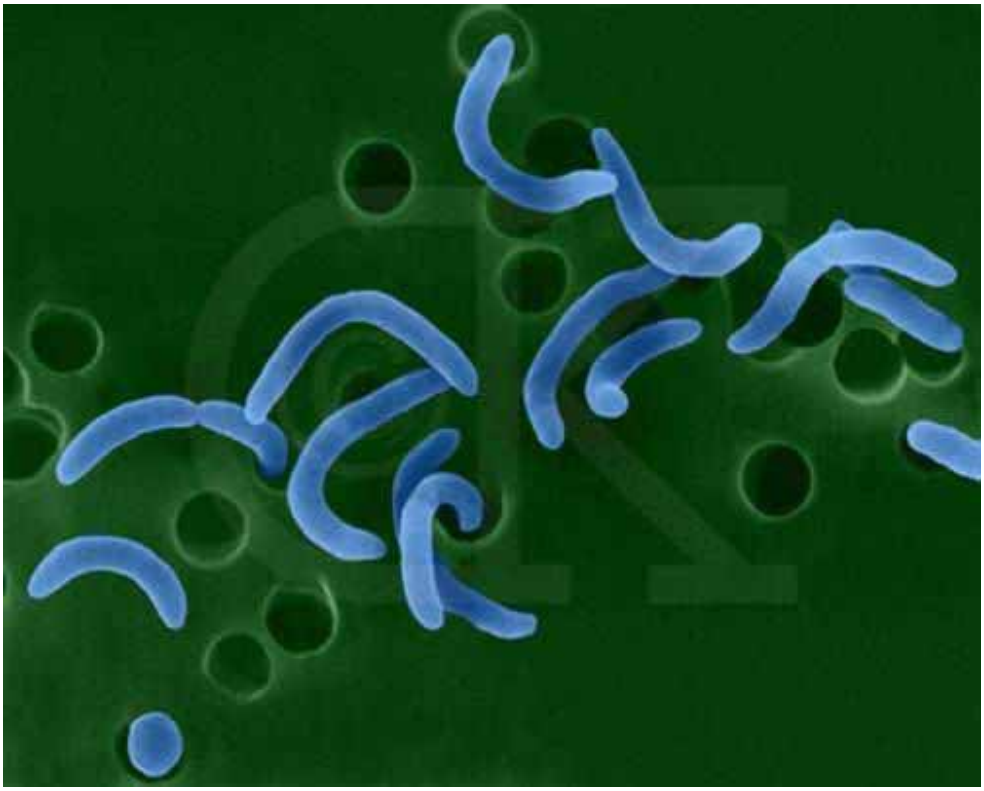


图 3-9 弧形霍乱菌图片来自 http://www.denniskunkel.com/

（一）细胞壁

细胞壁厚度因细菌不同而异，一般为 15-30nm。主要成分是肽聚糖，由 N-乙酰葡糖胺和 N-乙酰胞壁酸构成双糖单元，以 β（1-4）糖苷键连接成大分子。N-乙酰胞壁酸分子上有四肽侧链，相邻聚糖纤维之间的短肽通过肽桥（革兰氏阳性菌）或肽键（革兰氏阴性菌）桥接起来（图 3-10），形成了肽聚糖片层，像胶合板一样，粘合成多层。

肽聚糖中的多糖链在各物种中都一样，而横向短肽链却有种间差异。革兰氏阳性菌细胞壁厚约 20～80nm，有 15-50 层肽聚糖片层，每层厚 1nm，含 20-40％的磷壁酸（teichoic acid）[7]，有的还具有少量蛋白质。革兰氏阴性菌细胞壁厚约 10nm，仅 2-3 层肽聚糖，其他成分较为复杂，由外向内依次为脂多糖、细菌外膜和脂蛋白。此外，外膜与细胞之间还有间隙。

肽聚糖是革兰阳性菌细胞壁的主要成分，凡能破坏肽聚糖结构或抑制其合成的物质，都有抑菌或杀菌作用。如溶菌酶是 N-乙酰胞壁酸酶，青霉素抑制转肽酶的活性，抑制肽桥形成。

[7]由核糖醇或甘油残基经磷酸二脂键互相连接而成的多聚物，功能尚不明确。

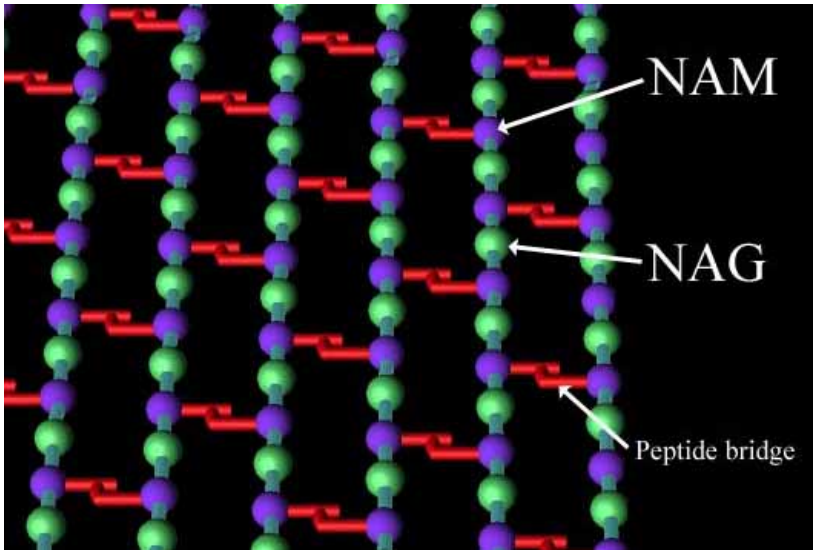


图 3-10 细胞壁的结构

细菌细胞壁的功能包括：保持细胞外形；抑制机械和渗透损伤（革兰氏阳性菌的细胞壁能耐受 20kg/cm2 的压力）；介导细胞间相互作用（侵入宿主）；防止大分子入侵；协助细胞运动和分裂。

脱壁的细胞称为细菌原生质体（bacterial protoplast）或球状体（spheroplast，因脱壁不完全），脱壁后的细菌原生质体，生存和活动能力大大降低。

（二）细胞膜

是典型的单位膜结构，厚约 8~10nm，外侧紧贴细胞壁，某些革兰氏阴性菌还具有细胞外膜。通常不形成内膜系统，除核糖体外，没有其它类似真核细胞的细胞器，呼吸和光合作用的电子传递链位于细胞膜上。某些行光合作用的原核生物（蓝细菌和紫细菌），质膜内褶形成结合有色素的内膜，与捕光反应有关。某些革兰氏阳性细菌质膜内褶形成小管状结构，称为中膜体（mesosome）或间体（图 3-11），中膜体扩大了细胞膜的表面积，提高了代谢效率，有拟线粒体（Chondroid）之称，此外还可能与 DNA 的复制有关。

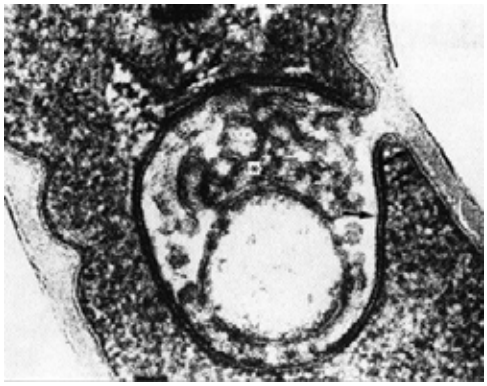


图 3-11 白喉杆菌的间体

（三）细胞质与核质体

细菌和其它原核生物一样，没有核膜，DNA 集中在细胞质中的低电子密度区，称核区或核质体（nuclear body）。细菌一般具有 1-4 个核质体，多的可达 20 余个。核质体是环状的双链 DNA 分子，所含的遗传信息量可编码 2000～3000 种蛋白质，空间构建十分精简，没有内含子。由于没有核膜，因此 DNA 的复制、RNA 的转录与蛋白的质合成可同时进行，而不像真核细胞那样这些生化反应在时间和空间上是严格分隔开来的。

每个细菌细胞约含 5000～50000 个核糖体，部分附着在细胞膜内侧，大部分游离于细胞质中。细菌核糖体的沉降系数为 70S，由大亚单位（50S）与小亚单位（30S）组成，大亚单位含有 23SrRNA，5SrRNA 与 30 多种蛋白质，小亚单位含有 16SrRNA 与 20 多种蛋白质。30S 的小亚单位对四环素与链霉素很敏感，50S 的大亚单位对红霉素与氯霉素很敏感。

细菌核区 DNA 以外的，可进行自主复制的遗传因子，称为质粒（plasmid）。质粒是裸露的环状双链 DNA 分子，所含遗传信息量为 2~200 个基因，能进行自我复制，有时能整合到核 DNA 中去。质粒 DNA 在遗传工程研究中很重要，常用作基因重组与基因转移的载体。

胞质颗粒是细胞质中的颗粒，起暂时贮存营养物质的作用，包括多糖、脂类、多磷酸盐等。

（四）其他结构

许多细菌的最外表还覆盖着一层多糖类物质，边界明显的称为荚膜（capsule，图 3-12），如肺炎球菌，边界不明显的称为粘液层（slime layer），如葡萄球菌。荚膜对细菌的生存具有重要意义，细菌不仅可利用荚膜抵御不良环境；保护自身不受白细胞吞噬；而且能有选择地粘附到特定细胞的表面上，表现出对靶细胞的专一攻击能力。例如，伤寒沙门杆菌能专一性地侵犯肠道淋巴组织。细菌荚膜的纤丝还能把细菌分泌的消化酶贮存起来，以备攻击靶细胞之用。

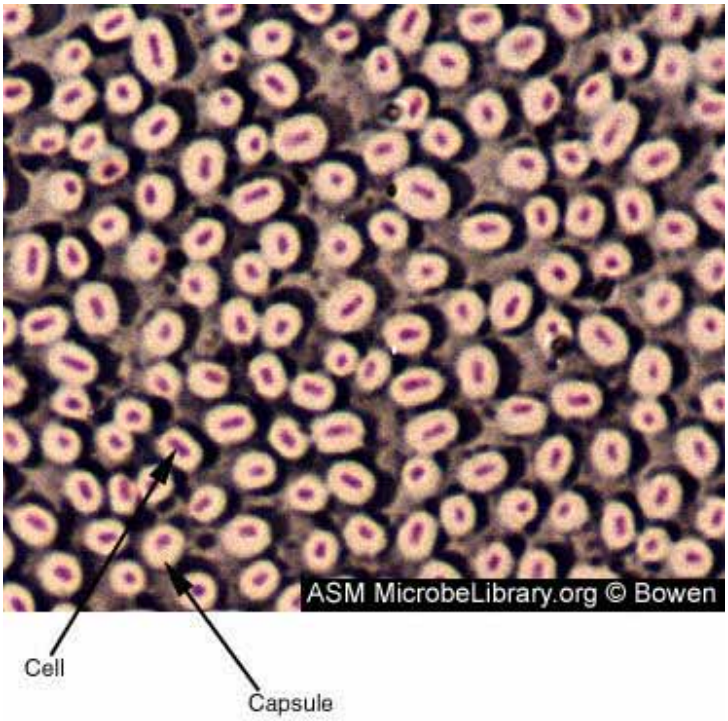


图 3-12 一种细菌的负染照片，显示荚膜 图片来自 http://www.microbelibrary.org

鞭毛（图 3-13）是某些细菌的运动器官，由一种称为鞭毛蛋白（flagellin）的弹性蛋白构成，结构上不同于真核生物的鞭毛。细菌可以通过调整鞭毛旋转的方向（顺和逆时针）来改变运动状态。

菌毛（图 3-14）是菌体表面极其的蛋白纤细，须用电镜观察。特点是：细、短、直、硬、多，菌毛与细菌运动无关，根据形态、结构和功能，可分为普通菌毛和性菌毛两类。前者与细菌吸附和侵染宿主有关，后者为中空管子，与传递遗传物质有关。

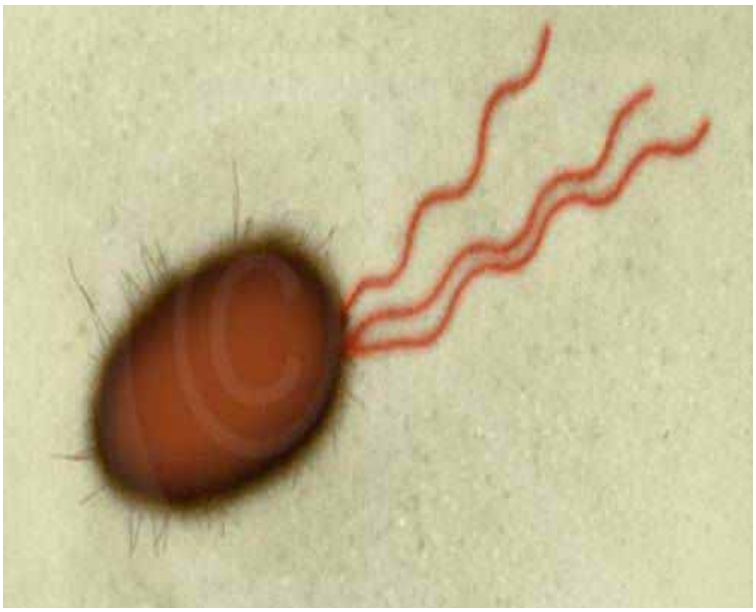


图 3-13 细菌的鞭毛 图片来自 http://www.denniskunkel.com/

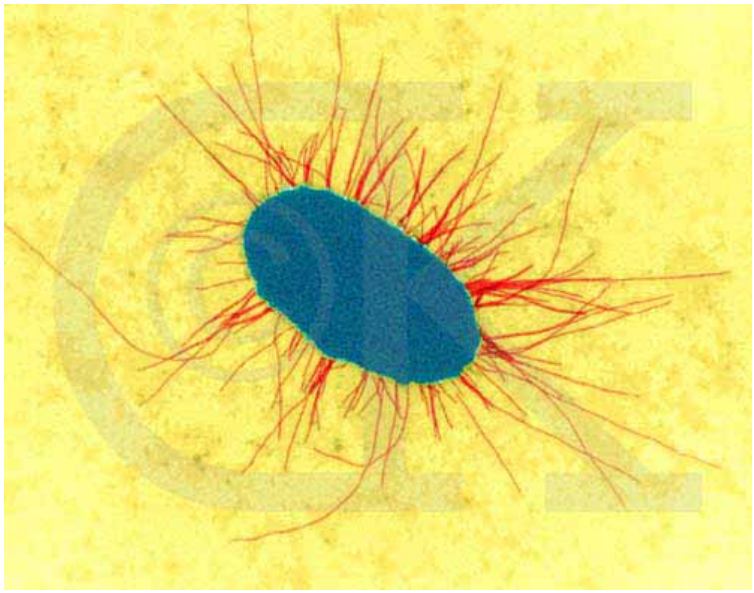


图 3-14 大肠杆菌的菌毛图片来自 http://www.denniskunkel.com/

（五）繁殖

细菌一二分裂的方式繁殖（图 3-15），某些细菌处于不利的环境，或耗尽营养时，形成内生孢子，又称芽孢（图 3-16），是对不良环境有强抵抗力的休眠体，由于芽胞在细菌细胞内形成，故常称为内生孢子。

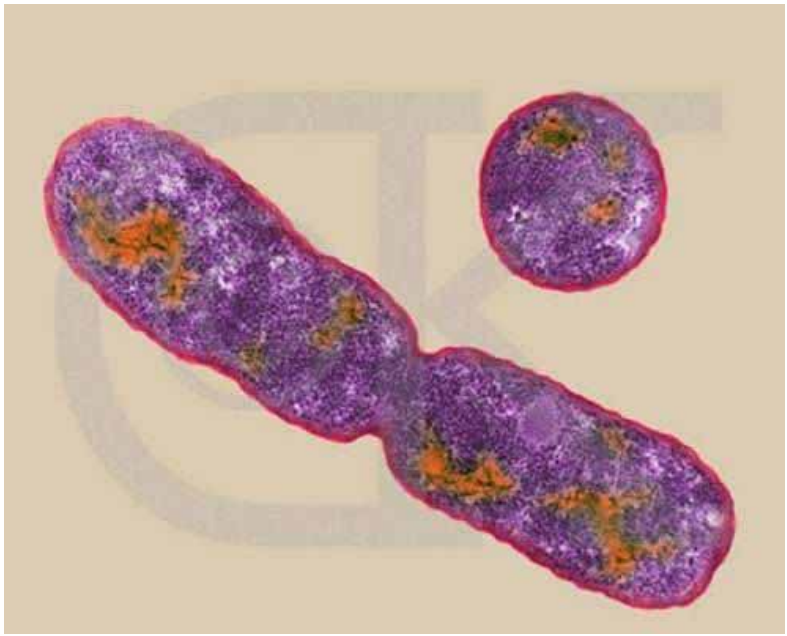


图 3-15 大肠杆菌的分裂 图片来自 http://www.denniskunkel.com/

芽孢的生命力非常顽强，有些湖底沉积土中的芽抱杆茵经 500-1000 年后仍有活力，肉毒梭菌的芽孢在 pH 7.0 时能耐受 100℃煮沸 5-9.5 小时。芽孢由内及外有

以下几部分组成：

1．芽孢原生质（spore protoplast，核心 core）：含浓缩的原生质。

2．内膜（inner membrane）：由原来繁殖型细菌的细胞膜形成，包围芽孢原生质。

3．芽孢壁（spore wall）：由繁殖型细菌的肽聚糖组成，包围内膜。发芽后成为细菌的细胞壁。

4．皮质（cortex）：是芽孢包膜中最厚的一层，由肽聚糖组成，但结构不同于细胞壁的肽聚糖，交联少，多糖支架中为胞壁酐而不是胞壁酸，四肽侧链由 L-Ala 组成。

5．外膜（outer membrane）：也是由细菌细胞膜形成的。

6．外壳（coat）：芽孢壳，质地坚韧致密，由类角蛋白组成(keratinlike protein)，含有大量二硫键，具疏水性特征。

7．外壁（exosporium）：芽孢外衣，是芽孢的最外层，由脂蛋白及碳水化合物(糖类)组成，结构疏松。

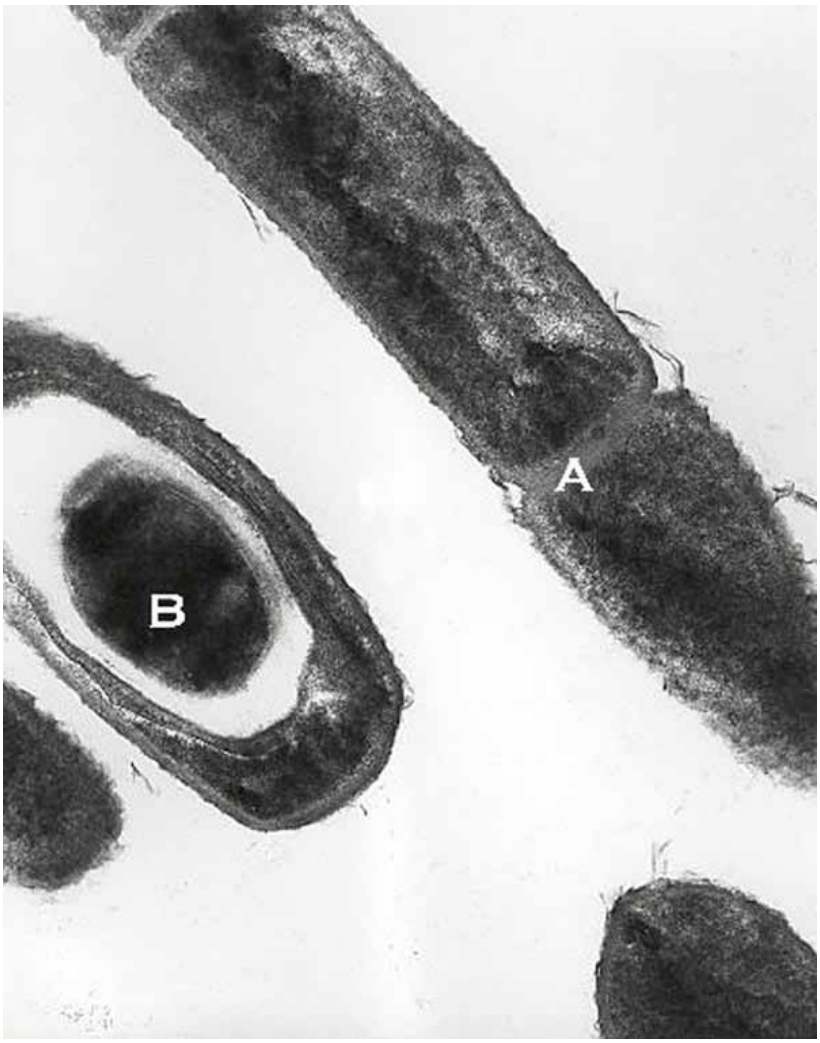


图 3-16 *Bacillus anthracis* 的芽孢(B) 图片来自 http://www.microbelibrary.org

二、支原体

支原体（mycoplasma）的大小通常为0.2~0.3μm，可通过滤菌器。无细胞壁，不能维持固定的形态而呈现多形性（图3-17）。细胞膜中胆固醇含量较多，约占36%，这对保持细胞膜的完整性是必需的，凡能作用于胆固醇的物质（如二性霉素B、皂素等）均可引起支原体膜的破坏而使支原体死亡。

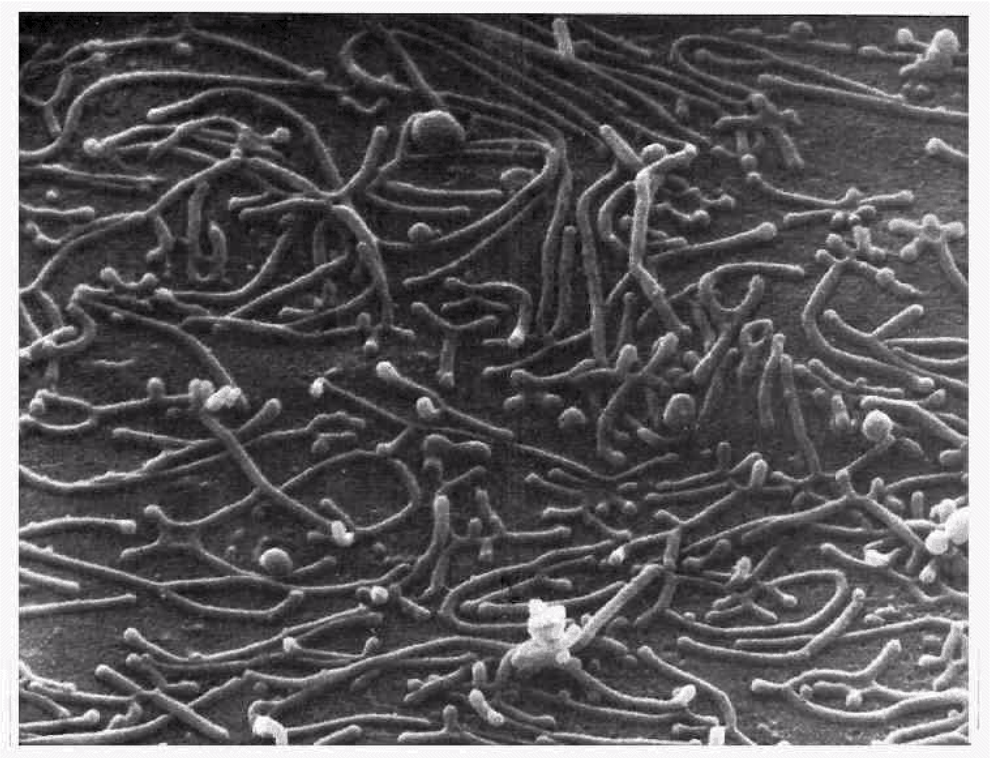


图3-17 肺炎支原体 图片来自http://s99.middlebury.edu/BI330A/

支原体基因组为一环状双链DNA，分子量小（仅有大肠杆菌的五分之一），合成与代谢很有限。肺炎支原体的一端有一种特殊的末端结构（terminal structure），能使支原体粘附于呼吸道粘膜上皮细胞表面，与致病性有关。

三、衣原体和立克次氏体

衣原体（Chlamydia）很小，直径 200nm-500nm，能通过滤菌膜。立克次氏体（Rickettsia）略大，大多不能通过滤菌膜。它们都有 DNA 和 RNA，有革兰氏阴性细菌特征的含肽聚糖的细胞壁，但酶系统不完全，必须在寄主细胞内生活，有摄能寄生物(energe parasite)之称。

砂眼是衣原体引起的，由于能形成包含体，起初被认为是大型病毒，1956 年，我国著名微生物学家汤飞凡及其助手张晓楼等人首次分离到沙眼的病原体。

衣原体生活史特殊，具有感染力的个体称为原体(elementory body)，体积小，有坚韧的细胞壁（图 3-18）。在宿主细胞内，原体逐渐伸长，形成无感染力的个体，称作体(initial body)，是一种薄壁的球状细胞，体积较大，通过二等分裂的方式在宿主细胞内形成一个微菌落，随后大量的子细胞有分化为具有感染能力的原体。

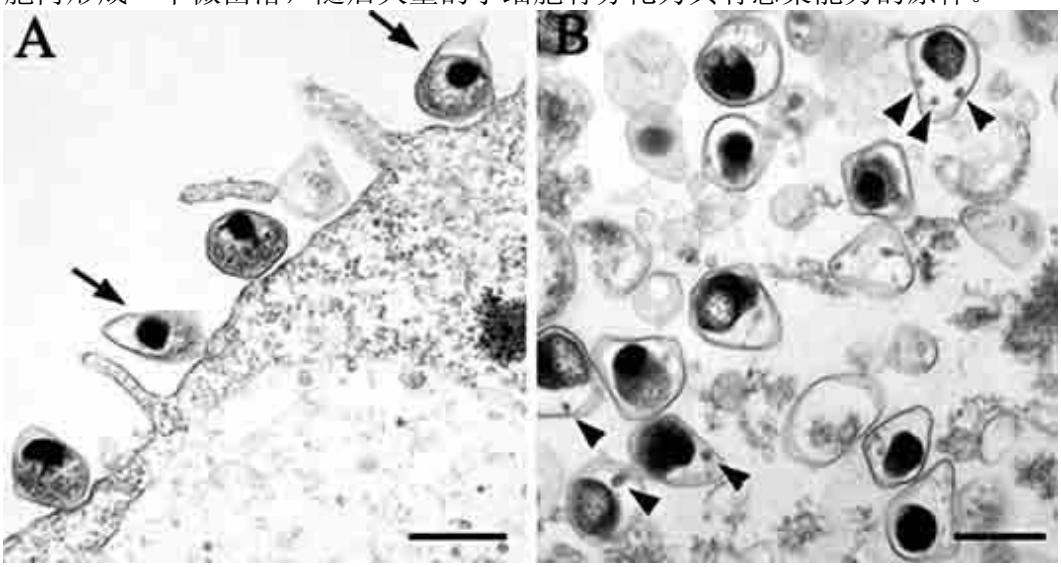


图 3-18 衣原体 *Chlamydia pneumoniae* 梨子形的原体（EBs），左、吸附在巨噬细胞表面，右、进入细胞内部的原体，图片来自 iwww.bioscience.org/2002/ v7/e/hahn/figures.htm

立克次氏体（图 3-19）也是专性细胞内寄生的，主要寄生于节肢动物，有的会通过蚤、虱、蜱、螨传入人体、如斑疹伤寒、战壕热。美国医生 H.T.Richetts 1909 年首次发现它是落基山斑疹伤寒的病原体，并于 1910 年牺牲于此病，故后人称这类病原体为立克次氏体。与衣原体的不同处在于其细胞较大，无滤过性，合成能力较强，且不形成包涵体。

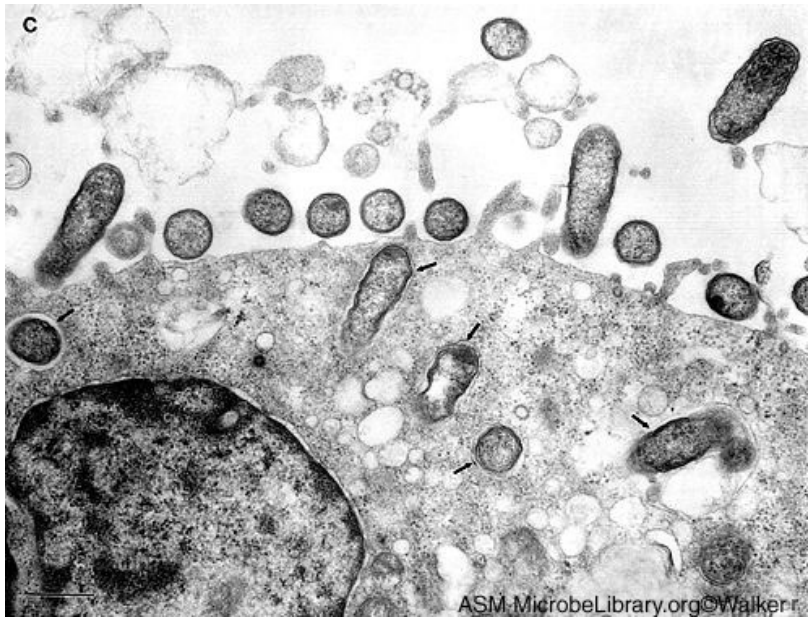


图 3-19 附着在内皮细胞表面的立克次氏体和细胞内包含立克次氏体的内吞体 图片来自 http://www.microbelibrary.org

四、蓝藻

蓝藻（图 3-20）又称蓝细菌（cyanobacterium），能进行与高等植物类似的光合作用（以水为电子供体，放出 O_2），与光合细菌的光合作用的机制不一样，因此被认为是最简单的植物。蓝藻没有叶绿体，仅有十分简单的光合作用结构装置。蓝藻细胞遗传信息载体与其它原核细胞一样，是一个环状 DNA 分子，但遗传信息量很大，可与高等植物相比。蓝藻细胞的体积比其它原核细胞大得多，直径一般在士 10um，甚至可达 70μm（颤藻）。蓝藻属单细胞生物，有些蓝藻经常以丝状的细胞群体存在，如：属蓝藻门念珠藻类的发菜（*nostoc commune var.flagtlliforme*）就是蓝藻的丝状体;做绿肥的红萍实际上是一种固氮蓝藻与水生蕨类满江红的共生体。

图 3-20 项圈藻 *Anabaena Cyanobacteria* 图片来自 http://www.microbelibrary.org

五、古细菌（archaebacteria）

是一类很持殊的细菌，多生活在极端的生态环境中。具有原核生物的某些特征，如无核膜及内膜系统；也有真核生物的特征，如以甲硫氨酸起始蛋白质的合成、核糖体对氯霉素不敏感、RNA 聚合酶和真核细胞的相似、DNA 具有内含子并结合组蛋白；此外还具有既不同于原核细胞也不同于真核细胞的特征，如：细胞膜中的脂类是不可皂化的；细胞壁不含肽聚糖，有的以蛋白质为主，有的含杂多糖，有的类似于肽聚糖，但都不含胞壁酸、D 型氨基酸和二氨基庚二酸。

极端嗜热菌（themophiles）：能生长在 90℃以上的高温环境。如斯坦福大学科学家发现的古细菌，最适生长温度为 100℃，80℃以下即失活，德国的斯梯特（K. Stetter）研究组在意大利海底发现的一族古细菌，能生活在 110℃以上高温中，最

适生长温度为 98℃，降至 84℃即停止生长；美国的 J. A. Baross 发现一些从火山口中分离出的细菌可以生活在 250℃的环境中。嗜热菌的营养范围很广，多为异养菌，其中许多能将硫氧化以取得能量。

极端嗜盐菌（extremehalophiles）：生活在高盐度环境中，盐度可达 25%，如死海和盐湖中。

极端嗜酸菌（acidophiles）：能生活在 pH 值 1 以下的环境中，往往也是嗜高温菌，生活在火山地区的酸性热水中，能氧化硫，硫酸作为代谢产物排出体外。

极端嗜碱菌（alkaliphiles）：多数生活在盐碱湖或碱湖、碱池中，生活环境 p H 值可达 11.5 以上，最适 p H 值 8～10。

产甲烷菌（metnanogens）：是严格厌氧的生物，能利用 CO_2 使 H_2 氧化，生成甲烷，同时释放能量。

$$CO_2+4H_2\rightarrow CH_4+2H_2O+能量$$

由于古细菌所栖息的环境和地球发生的早期有相似之处，如：高温、缺氧，而且由于古细菌在结构和代谢上的特殊性，它们可能代表最古老的细菌。它们保持了古老的形态，很早就和其它细菌分手了。所以人们提出将古细菌从原核生物中分出，成为与原核生物（即真细菌 eubacteria）、真核生物并列的一类。

表 3-2 原核细胞与真核细胞的区别

区别		原核细胞	真核细胞
大小		1~10μm	10~100μm
细胞核		无核膜	有双层的核膜
染色体	形状	环状 DNA 分子	线性 DNA 分子
	数目	一个基因连锁群	2 个以上基因连锁群
	组成	DNA 裸露或结合少量蛋白质	DNA 同组蛋白和非组蛋白结合
DNA 序列		无或很少有重复序列	有重复序列
基因表达		RNA 和蛋白质在同一区间合成	RNA 在核中合成和加工；蛋白质在细胞质中合成
细胞分裂		二分或出芽	有丝分裂和减数分裂，少数出芽生殖。
内膜		无独立的内膜	有，分化成各种细胞器
鞭毛构成		鞭毛蛋白	微管蛋白
光合与呼吸酶分布		质膜	线粒体和叶绿体
核糖体		70S（50S+30S）	80S（60S+40S）
营养方式		吸收，有的行光合作用	吸收，光合作用，内吞
细胞壁		肽聚糖、蛋白质、脂多糖、脂蛋白	纤维素（植物细胞）

六、细胞结构与生物系统

传统分类法根据生物的营养方式、运动能力和细胞结构的特点，把生物划分为动物界和植物界。植物细胞的主要特征是具有硬的细胞壁和进行光合作用的叶绿体。按传统分类系统，虽然大多数生物种容易归类，可是对某些生物来说却遇到了分类上的困难，例如眼虫（*Euglena*）是一种单细胞生物，含有叶绿体，却不具有细胞壁；细菌和真菌则有细胞壁而无叶绿体；支原体既无叶绿体也无细胞壁，古细菌既有原核生物的特征也具有真核生物的特征。这些生物按照传统分类法进行分类显然就要遇到困难。

1970 年 C. Woese 根据对 16SrRNA 核苷酸顺序的同源性比较，提出将生命划分为三界，即：真细菌（Eubacteria）、真核生物 Eucaryotes、古细菌（Archaes）。1996 年 Bult 领导的研究小组在 Science 上发表了詹氏甲烷球菌（*Methanococcus jannaschii*）的全基因组序列，进一步证明它既不是典型的细菌也不是典型的真核生物，而是介于两者之间的生命体，即生命的第三形式。

表 3-3 几种分类系统

<table>
<tr><th colspan="2" rowspan="2">传统分类</th><th colspan="4">按细胞结构分类</th><th rowspan="2">细胞类型</th></tr>
<tr><th colspan="2">Whittaker 1969</th><th colspan="2">Dodson 1971</th></tr>
<tr><td rowspan="3">植物界</td><td>细菌
蓝藻</td><td>原核生物界</td><td>细菌
蓝细菌</td><td>原核生物界</td><td>细菌
蓝细菌</td><td>原核细胞</td></tr>
<tr><td rowspan="2">金藻
绿藻
红藻
褐藻
粘菌
真正真菌
苔藓
维管植物
原生动物
后生动物
维管植物</td><td>原生生物界</td><td>金藻
原生动物</td><td rowspan="2">植物界</td><td rowspan="2">金藻
绿藻
红藻
褐藻
粘菌
真正真菌
苔藓
维管植物</td><td rowspan="2">真核细胞</td></tr>
<tr><td>真菌界</td><td>粘菌
真正真菌</td></tr>
<tr><td>动物界</td><td>原生动物
后生动物</td><td>动物界</td><td>后生动物</td><td>动物界</td><td>原生动物
后生动物</td><td></td></tr>
</table>

第三节 病毒与蛋白质感染因子

病毒（Virus）是一类非细胞形态的介于生命与非生命形式之间的物质。有以下主要特征：①个体微小，可通除滤菌器，大多数必须用电镜才能看见；②仅具有一种类型的核酸，或 DNA 或 RNA，没有含两种核酸的病毒；③专营细胞内寄生生活；④具有受体连结蛋白（receptor binding protein），与敏感细胞表面的病毒受体连结，进而感染细胞。

一、病毒的形态和结构

病毒的大小一般在 10~30nm 之间。结构简单，由核酸（DNA 或 RNA）芯和蛋白质衣壳（capsid）所构成，称核衣壳（nucleocapsid），衣壳有保护病毒核酸不受酶消化的作用。各种病毒所含的遗传信息量不同，少的只含有 3 个基因，多的可达 300 个不同的基因。

病毒衣壳由一至几种蛋白组成，组成病毒衣壳的亚单位称壳微粒（capsomer）。病毒的形成不需要酶的参加，只要条件具备，核酸和蛋白质便可自我装配（self assembly）成病毒。其装配形式有二十面体对称、螺旋对称和复合对称三种类型。二十面体对称型的衣壳蛋白形成二十面体，核酸包在其中；螺旋对称型的衣壳蛋白与核酸呈螺旋形排列，核酸交织在其中；复合对称型为同时具有或不具有两种对称性形式的病毒（图 3-21）。

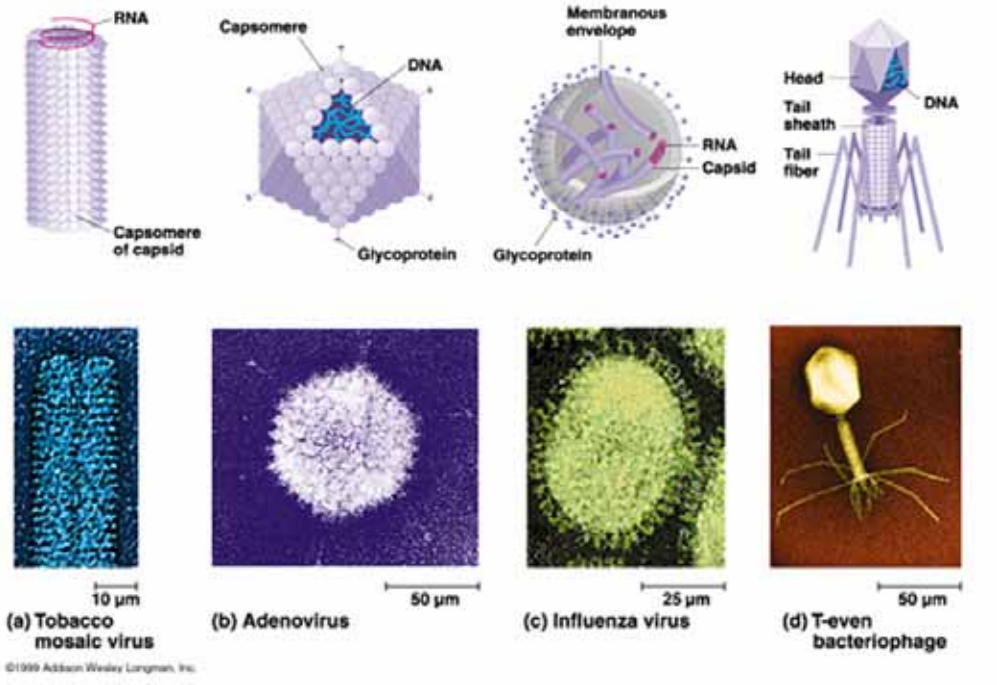


图 3-21 病毒衣壳的排列方式

一个成熟有感染性的病毒颗粒称“病毒体”（Virion）。电镜观察有五种形态；①球形（Sphericity）：大多数人类和动物病毒为球形，如脊髓灰质炎病毒（图 3-21）、疱疹病毒及腺病毒等；②丝形（Filament）：多见于植物病毒，如烟草花叶病病毒（图 3-22），人类流感病毒有时也是丝形；③弹形（Bullet-shape）：形似子弹头，如狂犬病毒、疱疹性口炎（图 3-23）病毒等，其他多为植物病毒。④砖形（Brick-shape）：如天花病毒（图 3-24）、牛痘苗病毒等；⑤蝌蚪形（Tadpole-shape）：由一卵圆形的头及一条细长的尾组成，如噬菌体（图 3-25）。其中①为二十面体对称；②、③为螺旋对称；④、⑤为复合对称。

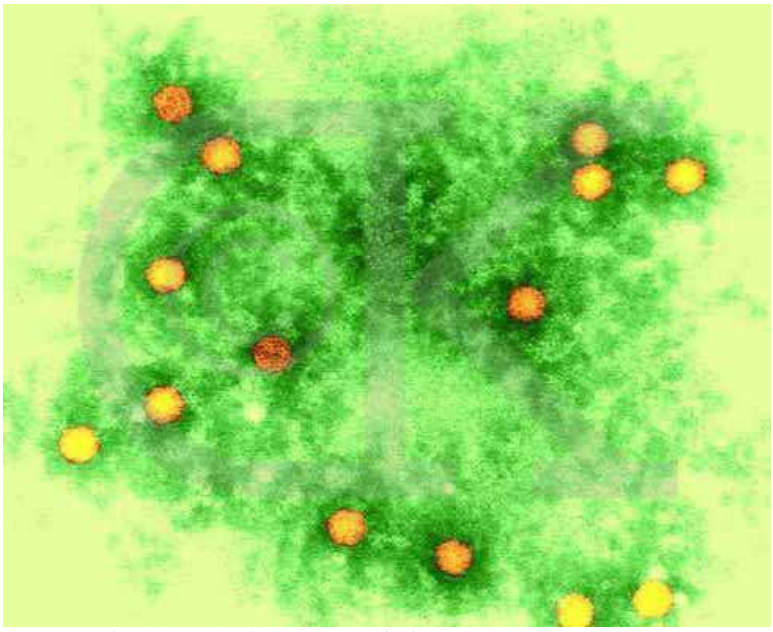


图 3-21 脊髓灰质炎病毒。图片来自 http://www.denniskunkel.com/

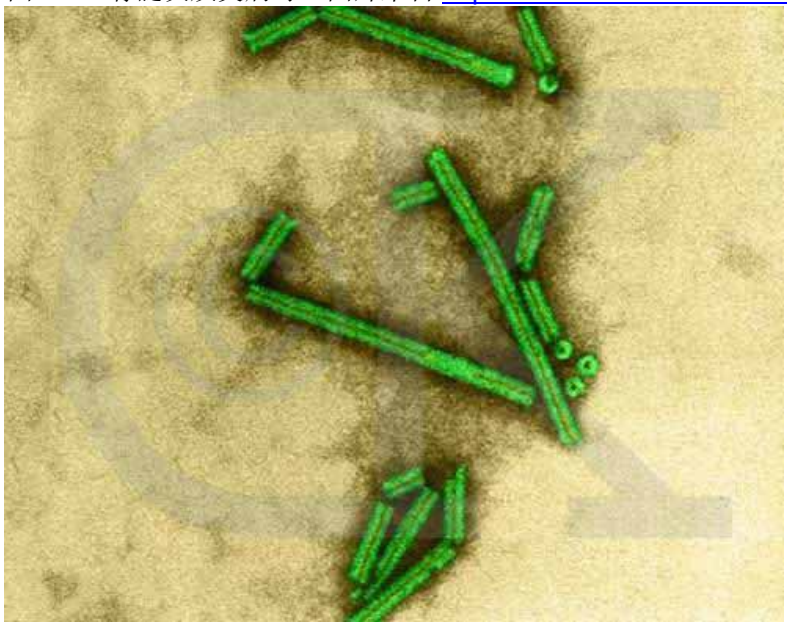


图 3-22 烟草花叶病毒。图片来自 http://www.denniskunkel.com/

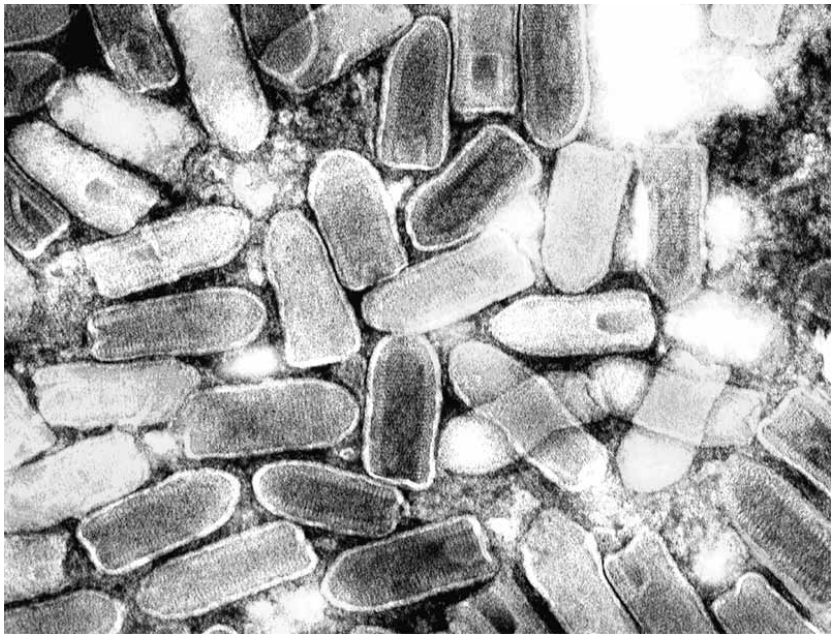


图 3-23 疱疹性口炎（vesicular stomatitis）病毒，形态与狂犬病毒相似，均为子弹形。图片来自 http://www.vetmed.ucdavis.edu

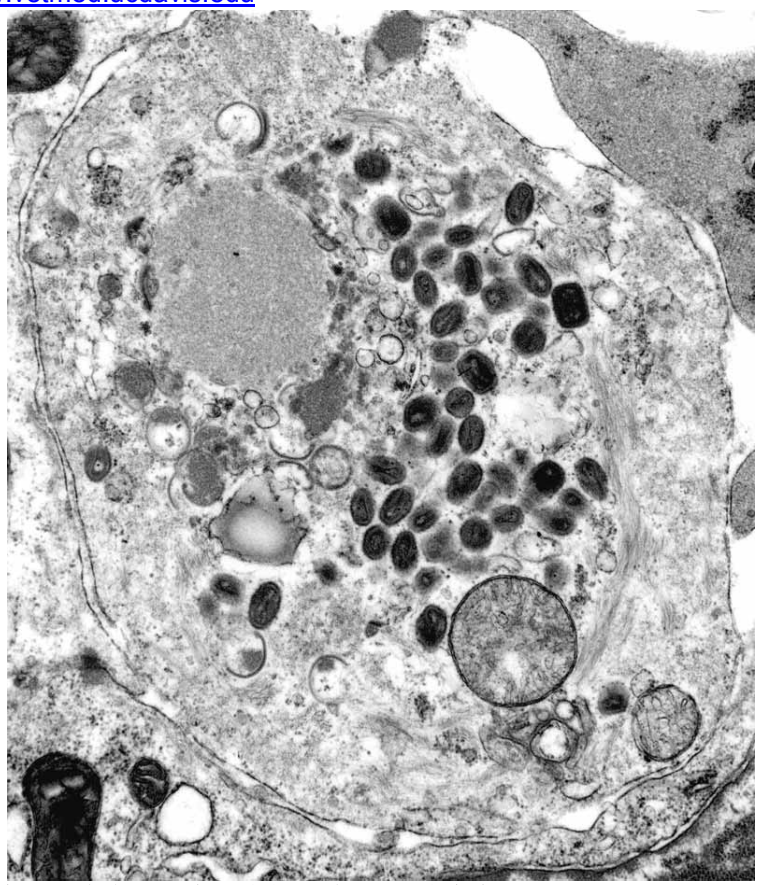


图 3-24 人类天花病毒（图中深染的颗粒）。图片来自 http://www.vetmed.ucdavis.edu

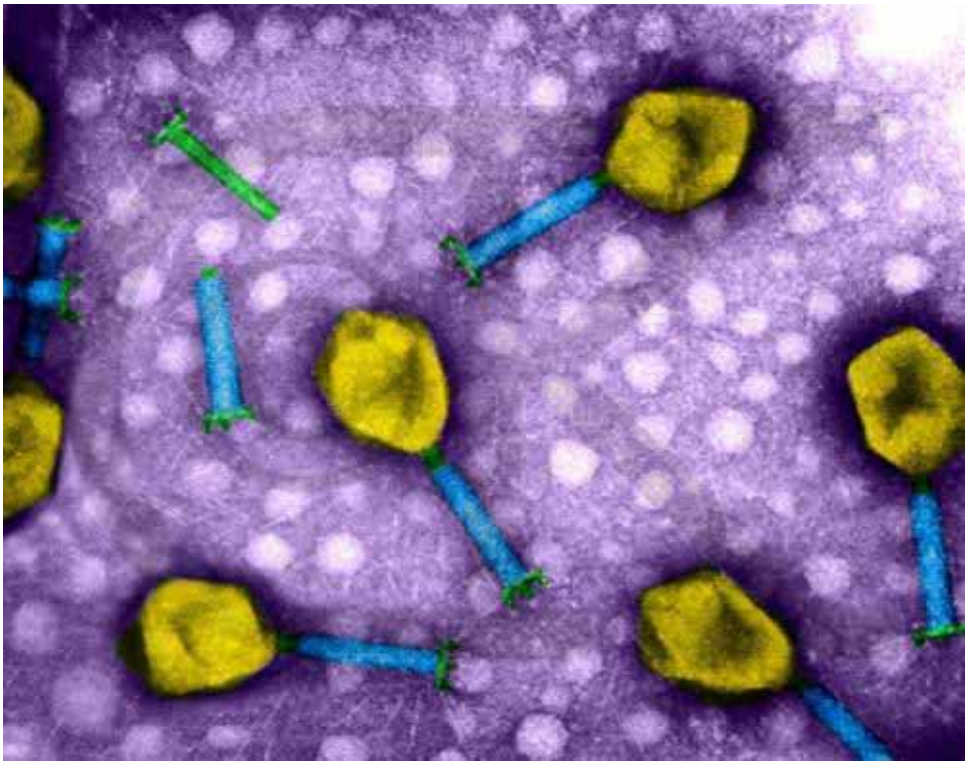


图 3-25 T4 噬菌体。 图片来自 http://www.denniskunkel.com/

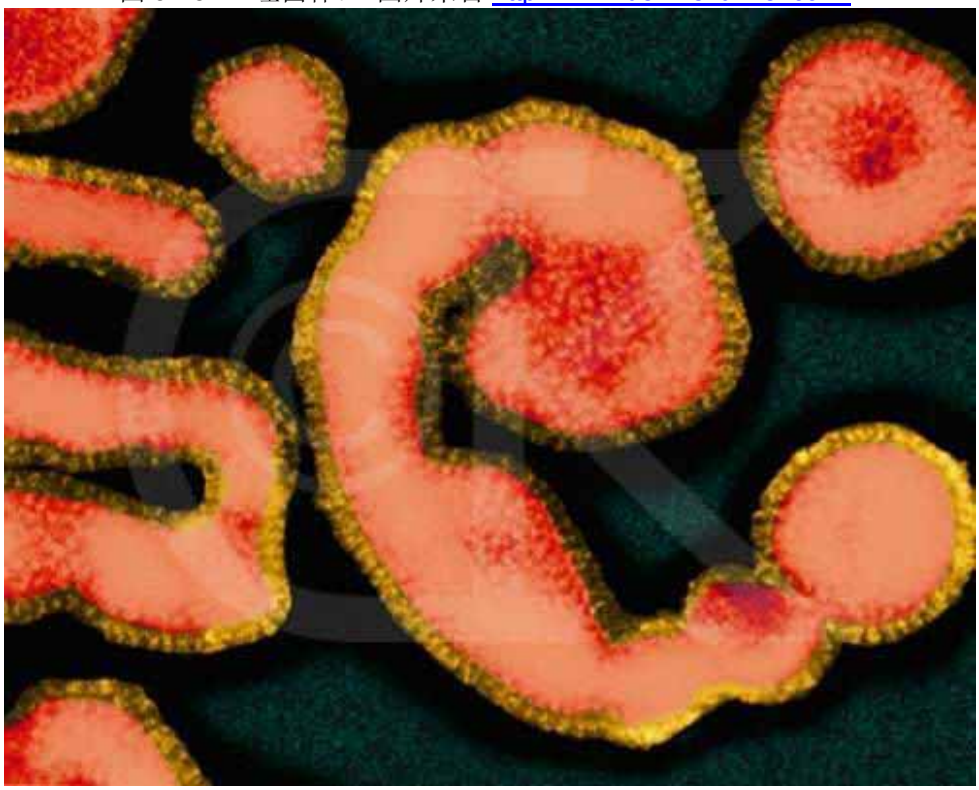


图 3-26 丝状有被膜的病毒（流感冒病毒）。图片来自 http://www.denniskunkel.com/

有的病毒衣壳外面尚有一层被膜（viral envelope，图 3-26），这层被膜是病毒

粒子脱离细胞时，包被上的宿主细胞的质膜，被膜中含有病毒融合蛋白（viral fusion protein），如流感病毒。病毒融合蛋白在病毒进入宿主细胞时起着关键作用。

病毒只有在侵入细胞以后才表现出生命现象。病毒的生活周期可分为两个阶段：一个是细胞外阶段，以成熟的病毒粒子形式存在；另一个是细胞内阶段，即感染阶段，在此阶段中进行复制和繁殖。感染阶段开始时，病毒的遗传物质由衣壳中释放出来，注入宿主细胞中，然后在病毒核酸信息的指导控制下，形成新的病毒粒子。

根据寄生的宿主不同，病毒可分为动物病毒、植物病毒和细菌病毒（即噬菌体）三大类。根据病毒所含的核酸的性质和状态不同，可将病毒分为 6 类：

1) 双链±DNA→+mRNA→蛋白质，如天花病毒、T-偶数噬菌体。
2) 单链+DNA→±DNA→+RNA→蛋白质。
3) 双链±RNA→+mRNA→蛋白质[8]，如呼肠孤病毒。
4) 单链+RNA→－RNA→+RNA→蛋白质脊髓灰质炎病毒。
5) 单链-RNA→+RNA→+蛋白质，如流感病毒、副流感病毒、狂犬病毒。
6) 单链+RNA→DNA→±DNA→+mRNA→蛋白质，即逆转录病毒（retrovirus）又称 RNA 肿瘤病毒（oncornavirus）。

二、类病毒

类病毒在结构上比病毒还要简单，没有蛋白质外壳，仅为一裸露的 RNA 分子。由于它们具有感染作用，类似于病毒，故称为类病毒（viroid）。它们不能像病毒那样感染细胞，只有当植物细胞受到损伤，失去了膜屏障，它们才能在供体植株与受体植株间传染。例如，马铃薯锤管类病毒仅由一个含 359 个核苷酸的单链环状 RNA 分子组成，链内有一些互补序列。分子长约 40~50nm，不能制造衣壳蛋白。

三、病毒的进化地位

无论是病毒还是类病毒都不具有独立进行生物合成的能力，它们都是细胞的寄生物，因此在进化上病毒的出现不可能早于细胞。病毒的前身很可能是在宿主染色体外独立进行复制的质粒（plasmid）。质粒既有 DNA 型的，也有 RNA 型的。它与病毒相似之处主要在于，它具有专一的核苷酸序列作为复制的起始部位。但它又不同于病毒，不能制造蛋白质外壳，不能像病毒一样从一个细胞传递到另一个细胞。当 DNA 质粒获得了为衣壳蛋白质编码的基因时，即意味着病毒出现了。

病毒能在种间传递核酸序列，因而它在生物进化上起着重要作用。由于病毒核

[8]病毒 RNA 的碱基序列与 mRNA 完全相同者，称为正链 RNA 病毒。这种病毒 RNA 可直接起病毒 mRNA 的作用，附着到宿主细胞核糖体上，翻译出病毒蛋白。从正链 RNA 病毒颗粒中提取出 RNA，注入适宜的细胞时有感染性；病毒 RNA 碱基序列与 mRNA 互补者，称为负链 RNA 病毒。负链 RNA 病毒的颗粒中含有依赖 RNA 的 RNA 聚合酶，可催化合成互补链，成为病毒 mRNA，翻译病毒蛋白，从负链 RNA 病毒颗粒中提取出的 RNA，因提取过程损坏了这种酶，而无感染性。

酸往往可同宿主染色体重组，所以病毒核酸就有可能连接上一小段宿主染色体，一同传递到另一种细胞或有机体中。更有甚者，病毒 DNA 整合到宿主染色体中，变成了宿主基因组的一部分，这部分 DNA 称为前病毒（provirus）。通过病毒在宿主细胞基因组间传递 DNA 序列的过程称为 DNA 转导（DNA transduction）。在生物工程和分子生物学研究中常通过这种途径来转导目的基因。病毒的某些属性在细胞的生命活动中也具有普遍意义，通过对病毒活动的研究有助于对生命现象的理解。例如：

1. 自我装配。病毒成分有限，结构简单，但只要成分齐备，条件适宜，即可自动装配成有活性的病毒。
2. 装配信息来自分子本身。
3. 遗传密码的统一性。病毒和细胞携带的遗传物质是相同的，使用了同一套遗传密码。
4. 自我复制。病毒进入细胞后，能够自我复制和繁殖，具有生命特征。

四、蛋白质感染因子

1982 年 S．B．Prusiner 以叙利亚仓鼠为实验材料，发现羊瘙痒病（scrapie）的病原体是一种蛋白质，不含核酸，命名为 prion，意即 PROteinnaceous Infection ONly，译为蛋白质感染因子或朊病毒，Prusiner 因此项发现更新了医学感染的概念，获 1997 年的诺贝尔生理与医学奖。

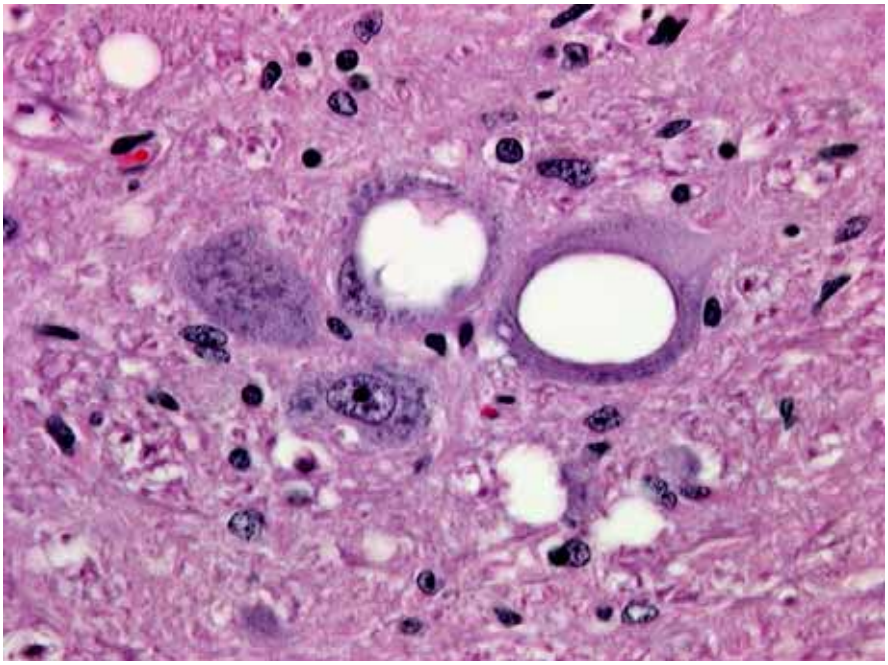


图 3-27 病羊神经组织的海绵状损伤 图片来自 http://www.vetmed.ucdavis.edu

羊瘙痒病发现已有 200 年的历史，羊得了这种病就会浑身发痒，不断在坚硬物质上搓擦身体，最后死亡。它是一类传染性海绵状脑病（transmissible spongiform encephalopathies，TSE）。疯牛病，即牛海绵状脑病（bovine spongiform

encephalopathy，BSE）也属于此类疾病，发现于 1986 年，是由于牛被喂以由死羊骨粉制造的饲料而被感染，病牛脑内灰质及神经元都有典型的海绵状退化（图 3-27、28），出现淀粉样（amyloid）蛋白沉淀（图 3-28），与羊瘙痒病相似。同类型的 prion 也会使鹿、貂及猴子患病，人类也具有类似的疾病。

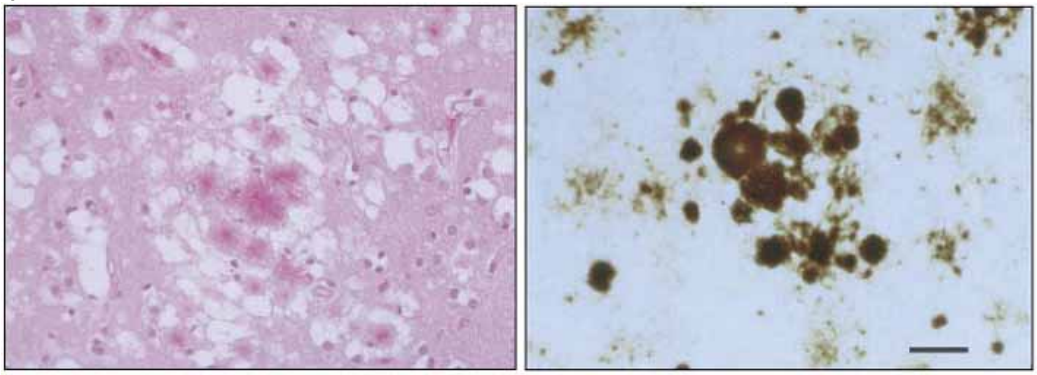


图3-28 vCJD病人大脑组织切片，左、海绵状病变及周围的沉淀斑，右、淀粉样蛋白沉淀，短线表示50um。引自Stanley B. Prusiner 1997

Prion 是一种结构变异的蛋白质，对高温和蛋白酶均具有较强的抵抗力。它能转变细胞内的此类正常的蛋白 PrP^{C}（cellular prion protein），使 PrP^{C} 发生结构变异，变为具有致病作用的 PrP^{Sc}（scrapie-associated prion protein）。

PrP^{C}存在于神经元、神经胶质细胞和其它一些细胞，属于糖磷脂酰肌醇锚定蛋白，集中在膜上的脂筏中，对蛋白酶和高温敏感，可能和细胞信号转导有关。

PrP^{Sc} 与 PrP^{c} 的一级结构相似（图 3-29），均由 253-4 个氨基酸组成，分子量约 33-37KD。纯化的 Prion 经傅里叶变换红外光谱分析，发现 PrP^{c} 的高级结构中具有 43%的 α 螺旋，极少的 β 折叠（3%），而 PrP^{sc} 具有 34%α 螺旋，43%的 β 折叠。动物被感染后，发生错误折叠的 PrP^{Sc} 蛋白堆积在脑组织中，形成不溶的淀粉样蛋白沉淀，无法被蛋白酶分解，引起神经细胞凋亡（Apoptosis）。

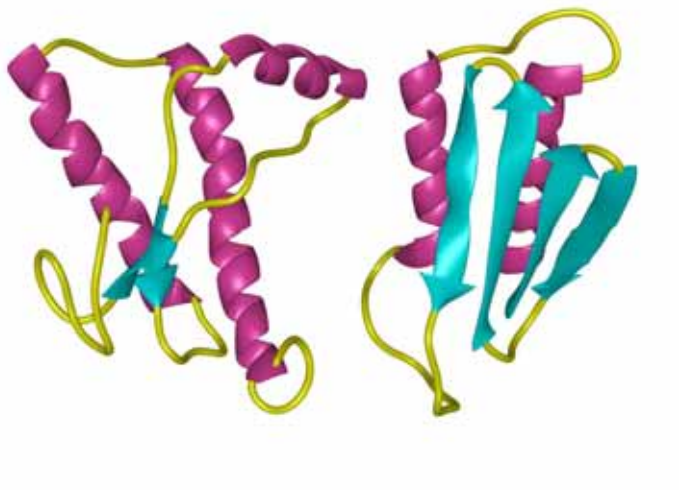


图 3-29 Prion 的结构模型，左 PrP^{c}，右 PrP^{Sc}　图片来自 http://www.cmpharm.ucsf.edu/cohen/media/pages/gallery.html

编码 PrP 蛋白的基因称为 Prnp，该基因位于人第 20 号染色体的短臂，小鼠第 2 号染色体。敲除小鼠的 Prnp 基因，小鼠仍能正常发育，并对瘙痒病完全免疫，但出生后很快会出现共济失调、小脑皮层颗粒细胞退化。

目前对蛋白质感染因子的增殖方式有两种解释（图 3-30），一是重折叠模型（refolding model），认为 PrP^{Sc} 分子起分子伴侣（molecular chaperone）的作用，能与 PrP^{c} 分子相结合，诱使 PrP^{c} 转变成 PrP^{Sc}，从而形成了 PrP^{Sc} 二聚体，于是一个 PrP^{Sc} 分子就变成了 2 个 PrP^{Sc} 分子，如此倍增不已。另一种解释是晶种模型（Seeding model），认为 PrP^{c} 分子本身有向 PrP^{Sc} 转变的倾向（一种平衡反应），PrP^{Sc} 能像晶种一样，稳定 PrP^{c} 的构象，形成淀粉样蛋白沉淀，然后碎裂后又变成新的晶种。

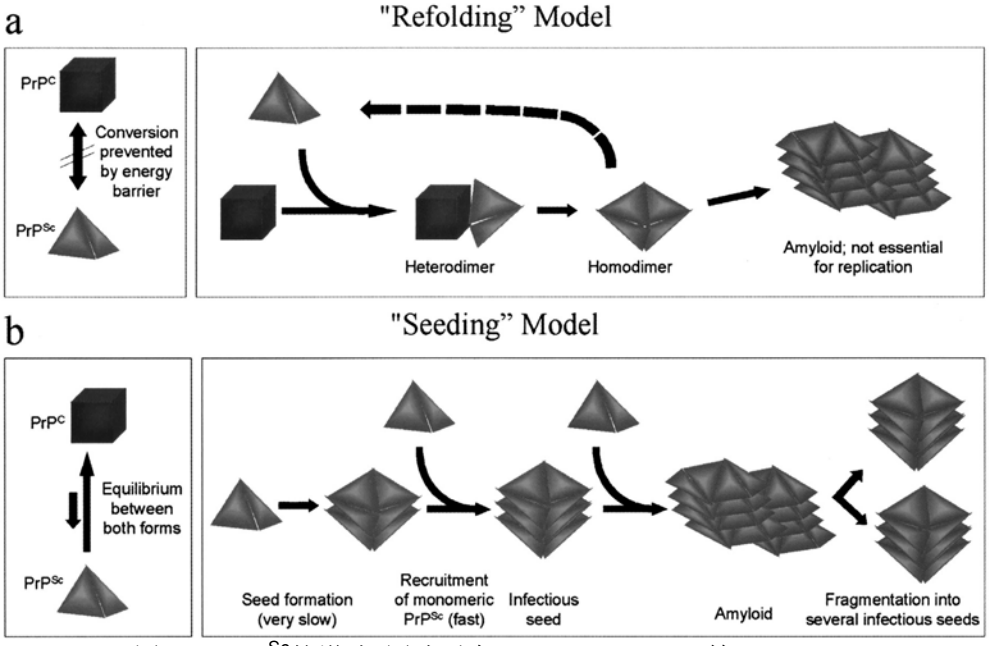


图3-30 PrP^{Sc}的增殖 图片引自Frank L. Heppner等2001

蛋白质感染因子的增殖既不是由于基因过分表达，也不是因翻译量增加，而是由于正常分子的构象发生转变造成的，所以亦称朊病毒。目前已知的人类 PRION 疾病主要有：

1. 克-雅二氏病（Creutzfeldt–Jakob disease，CJD）：Cruetzfeldt 和 Jakob 1920 年发现于六例患者，大多发生于 60 岁以上的人，是自身 PrP 蛋白发生变异引起的。
2. 变异型克-雅氏病（vCJD）：患者都处于以往 CJD 未曾出现的年龄段，为十几岁至三十岁的年轻人，是由于取食病牛产品而感染。患者首先出现忧郁症的病状，继而不能行走，并呈现精神障碍等痴呆症状，最后死亡。
3. GSS 综合征（Gerstmann-Straussler Scheinker disease））：是一种遗传的的慢性脑病，由 Prnp 基因缺陷引起，PrP 蛋白的 102 位亮氨酸被脯氨酸取代或 117 位的缬氨酸被丙氨酸取代。
4. 克鲁病（Kuru）：发现于新几内亚一个叫 Fore 的部落，当地人称作 kuru，意即颤抖。病人大多数是妇女及小孩，病症有言语含糊及无意识地狂笑，最后不省

人事并死亡。一名美国医生 D. C. Gajdusek 到了当地，发现那里的妇女及小孩具有吃死者尸体的习惯，结果受到感染。

5. 致死性家族性失眠症（Fatal familial insomnia，FFI）：也是一种遗传性疾病，Prnp 基因变异，PrP 蛋白 178 位的天冬酰胺被天冬氨酸取代。患者的主要症状是失眠，并有 CJD 的症状。

对于蛋白质感染因子引起的疾病，目前尚没有有效的治疗措施。这类蛋白具有很强的抵抗力，对抗生素和消毒剂不敏感，134-138℃持续 1h 的病牛脑组织匀浆，以及 10%福尔马林固定过的病羊脑组织，仍有感染性。

据报道，自 1996 年以来，共有 106 人得了疯牛病，其中仅有七人还活着。

第四节 细胞的化学成分

组成细胞的基本元素是：O、C、H、N、Si、K、Ca、P、Mg，其中 O、C、H、N 四种元素占 90%以上。细胞化学物质可分为两大类：无机物和有机物。在无机物中水是最主要的成分，约占细胞物质总含量的 75％—80％。

一、水与无机盐

（一）水是原生质最基本的物质

水在细胞中不仅含量最大，而且由于它具有一些特有的物理化学属性，使其在生命起源和形成细胞有序结构方面起着关键的作用。可以说，没有水，就不会有生命。水在细胞中以两种形式存在：一种是游离水，约占 95％；另一种是结合水，通过氢键或其他键同蛋白质结合，约占 4％~5％。随着细胞的生长和衰老，细胞的含水量逐渐下降，但是活细胞的含水量不会低于 75％。

水在细胞中的主要作用是，溶解无机物、调节温度、参加酶反应、参与物质代谢和形成细胞有序结构。水之所以具有这么多的重要功能是和水的特有属性分不开的。

1．水分子是偶极子

从化学结构上看，水分子似乎很简单，仅是由 2 个氢原子和 1 个氧原子构成（H_2O）。然而水分子中的电荷分布是不对称的，一侧显正电性，另一侧显负电性，从而表现出电极性，是一个典型的偶极子（图 3-31）。正由于水分子具有这一特性，它既可以同蛋白质中的正电荷结合，也可以同负电荷结合。蛋白质中每一个氨基酸平均可结合 2.6 个水分子。

由于水分子具有极性，产生静电作用，因而它是一些离子物质（如无机盐）的良好溶剂。

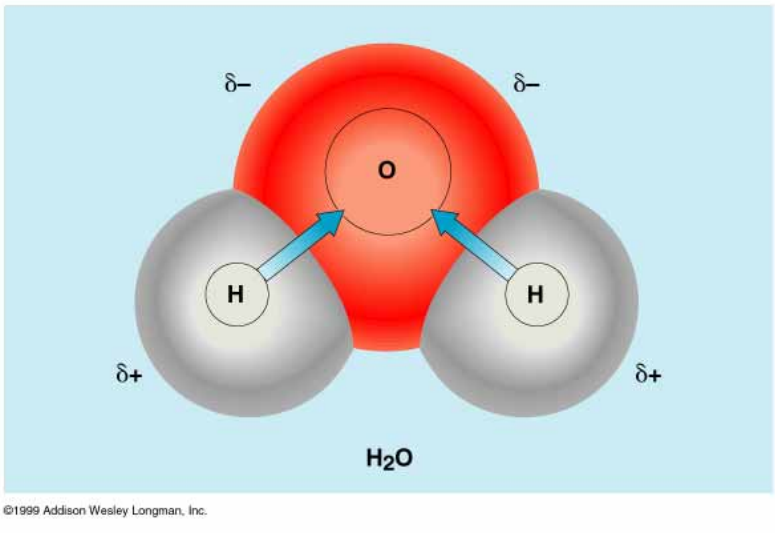


图 3-31 水分子结构模型

2．水分子间可形成氢键

由于水分子是偶极子，因而在水分子之间和水分子与其他极性分子间可建立弱作用力的氢键。在水中每一氧原子可与另两个水分子的氢原子形成两个氢键。氢键作用力很弱，因此分子间的氢键经常处于断开和重建的过程中。

3．水分子可解离为离子

水分子可解离为氢氧离子（OH^-）和氢离子（H^+）。在标准状况下总有少量水分子解离为离子，大约有 10^7mol/L 水分子解离，相当于每 10^9 个水分子中就有 2 个解离。但是水分子的电解并不稳定，总是处于分子与离子相互转化的动态平衡之中。

表 3-4 阳离子在细胞中的作用

离子种类	在细胞中的作用
Fe^{2+} 或 Fe^{3+}	血红蛋白、细胞色素、过氧化物酶和铁蛋白的组成成分
Na^+	维持膜电位
K^+	参与蛋白质合成和某些酶促合成
Mg^{2+}	叶绿素、磷酸酶、Na'—K'泵
Mn^{2+}	肽酶
Cu^{2+}	酪氨酸酶、抗坏血酸氧化酶
Co^{2+}	肽酶
Mo^{2+}	硝酸还原酶、黄嘌呤氧化酶
Ca^{2+}	钙调素、肌动球蛋白、ATP 酶

（二）无机盐

细胞中无机盐的含量很少，约占细胞总重的 1%。盐在细胞中解离为离子，离子的浓度除了具有调节渗透压和维持酸碱平衡的作用外，还有许多重要的作用。

主要的阴离子有 Cl^-、PO_4^-和 HCO_3^-，其中磷酸根离子在细胞代谢活动中最为重要：①在各类细胞的能量代谢中起着关键作用；②是核苷酸、磷脂、磷蛋白和磷酸化糖的组成成分；③调节酸碱平衡，对血液和组织液 pH 起缓冲作用。

主要的阳离子有：Na^+、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}、Mn^{2+}、Cu^{2+}、Co^{2+}、Mo^{2+}。

二、细胞的有机分子

细胞中有机物达几千种之多，约占细胞干重的 90％以上，它们主要由碳、氢、氧、氮等元素组成。有机物中主要由四大类分子所组成，即蛋白质、核酸、脂类和糖，这些分子约占细胞干重的 90%以上。

（一）蛋白质

在生命活动中，蛋白质是一类极为重要的大分子，几乎各种生命活动无不与蛋白质的存在有关。蛋白质不仅是细胞的主要结构成分，而且更重要的是，生物专有的催化剂——酶是蛋白质，因此细胞的代谢活动离不开蛋白质。一个细胞中约含有 10^4 种蛋白质，分子的数量达 10^{11} 个。

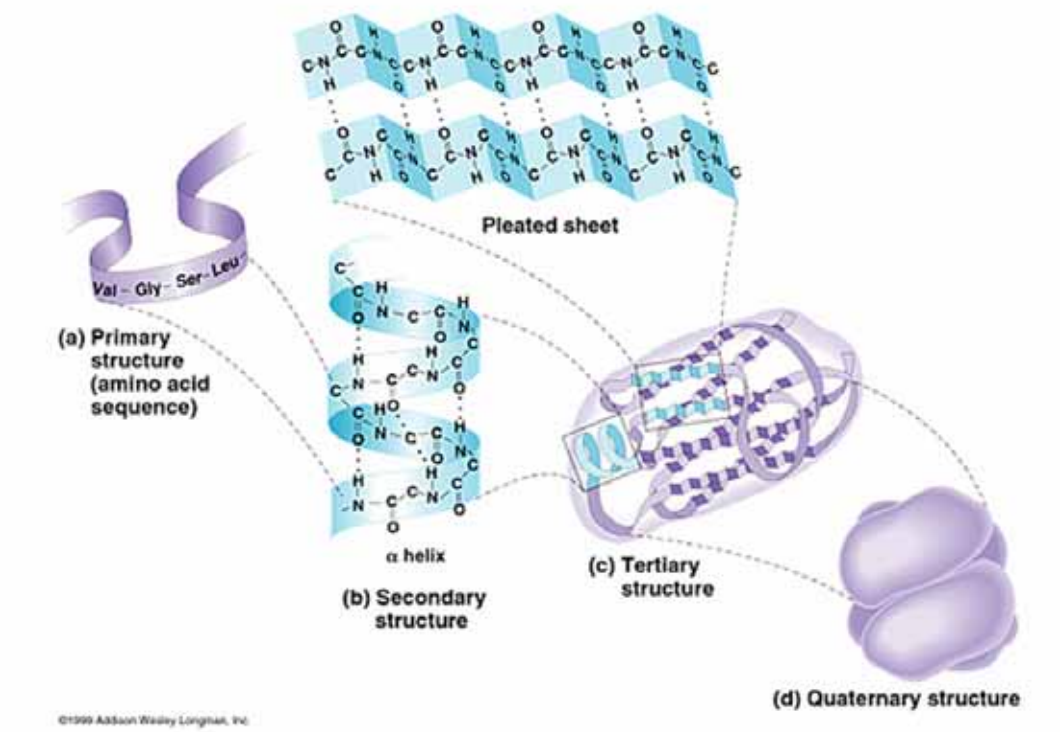


图 3-32 蛋白质的结构

（二）核酸

核酸是生物遗传信息的载体分子，所有生物均含有核酸。核酸是由核苷酸单体聚合而成的大分子。核酸可分为核糖核酸 RNA 和脱氧核糖核酸两大类 DNA。当温度上升到一定高度时，DNA 双链即解离为单链，称为变性（denaturation）或熔解（melting），这一温度称为熔解温度（melting temperature，Tm）。碱基组成不同的 DNA，熔解温度不一样，含 G—C 对（3 条氢键）多的 DNA，Tm 高；含 A—T 对（2 条氢键）多的，Tm 低。当温度下降到一定温度以下，变性 DNA 的互补单链又可通过在配对碱基间形成氢键，恢复 DNA 的双螺旋结构，这一过程称为复性（renaturation）或退火（annealing）。

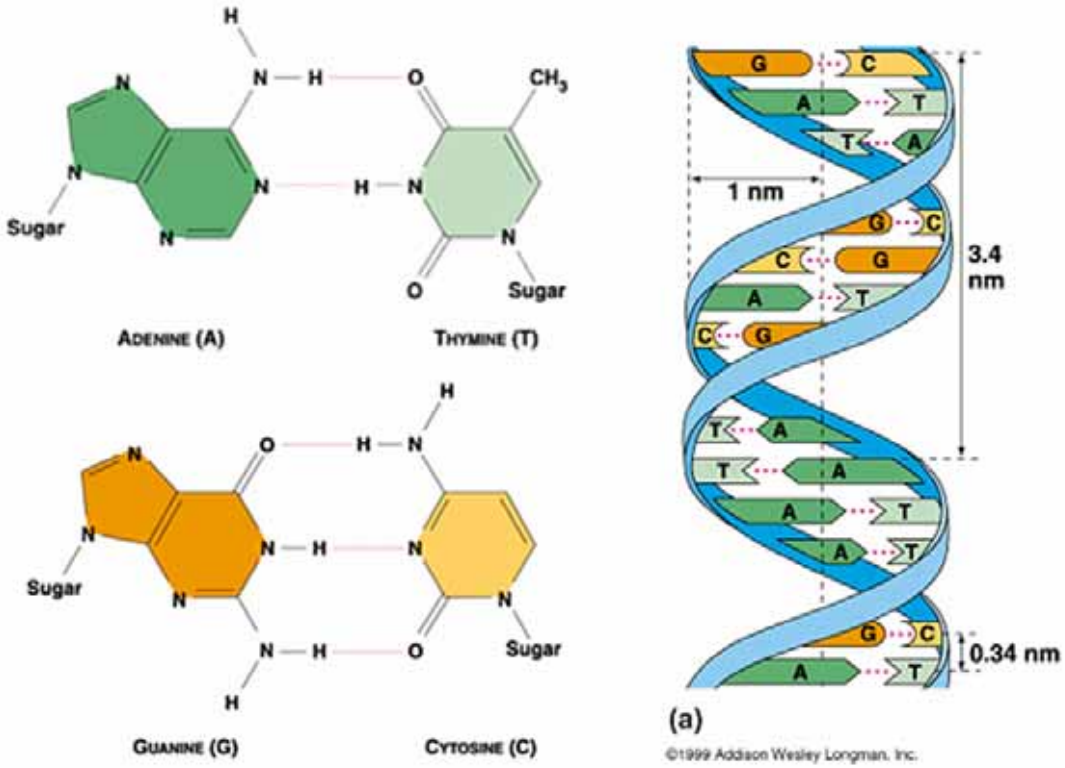


图 3-33 DNA 的结构

DNA 有三种主要构象（图 3-35）：

B-DNA：为 Watson&Click 提出的右手螺旋模型，每圈螺旋 10 个碱基，螺旋扭角为 36 度，螺距 34A，每个碱基对的螺旋上升值为 3.4A，碱基倾角为-2 度。

A-DNA：为右手螺旋，每圈螺旋 10.9 个碱基，螺旋扭角为 33 度，螺距 32A，每个碱基对的螺旋上升值为 2.9A，碱基倾角为 13 度。

Z-DNA：为左手螺旋，每圈螺旋 12 个碱基，螺旋扭角为-51 度（G—C）和-9 度（C—G），螺距 46A，每个碱基对的螺旋上升值为 3.5A（G—C）和 4.1A（C—G），碱基倾角为 9 度。

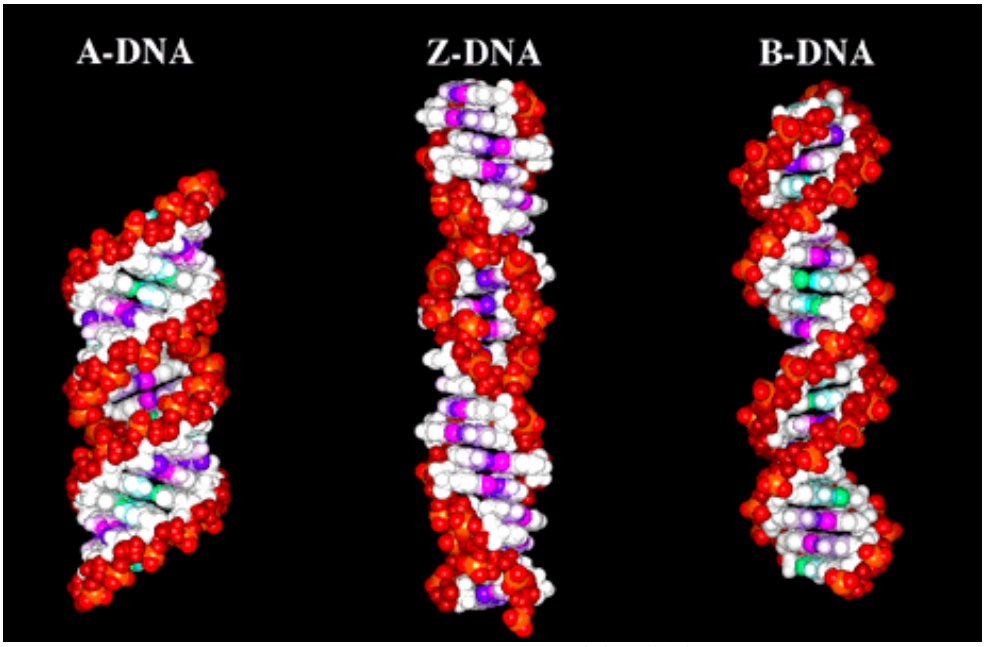


图 3-34 DNA 的三种主要构象

（三）糖类

细胞中的糖类既有单糖，也有多糖。细胞中的单糖是作为能源以及与糖有关的化合物的原料存在。重要的单糖为五碳糖（戊糖）和六碳糖（己糖），其中最主要的五碳糖为核糖，最重要的六碳糖为葡萄糖。葡萄糖不仅是能量代谢的关键单糖，而且是构成多糖的主要单体。

多糖在细胞结构成分中占有主要的地位。细胞中的多糖基本上可分为两类：一类是营养储备多糖；另一类是结构多糖。作为食物储备的多糖主要有两种，在植物细胞中为淀粉（starch），在动物细胞中为糖原（glycogen）。在真核细胞中结构多糖主要有纤维素（cellulose）和几丁质（chitin）。

（四）脂类

脂类包括：脂肪酸、中性脂肪、类固醇、蜡、磷酸甘油酯、鞘脂、糖脂、类胡萝卜素等。脂类化合物难溶于水，而易溶于非极性有机溶剂。

1、中性脂肪（neutral fat）

①甘油酯：它是脂肪酸的羧基同甘油的羟基结合形成的甘油三酯（triglyceride）。甘油酯是动物和植物体内脂肪的主要贮存形式。当体内碳水化合物、蛋白质或脂类过剩时，即可转变成甘油酯贮存起来。甘油酯为能源物质，氧化时可比糖或蛋白质释放出高两倍的能量。营养缺乏时，就要动用甘油酯提供能量。

②蜡：脂肪酸同乙醇酯化形成蜡（如蜂蜡）。蜡的碳氢链很长，熔点要高于甘

油酯。细胞中不含蜡质，但有的细胞可分泌蜡质。如：植物表皮细胞分泌的蜡膜；同翅目昆虫的蜡腺、如高等动物外耳道的耵聍腺。

2、磷脂

磷脂对细胞的结构和代谢至关重要，它是构成生物膜的基本成分，也是许多代谢途径的参与者。分为甘油磷脂和鞘磷脂两大类。

3、糖脂

糖脂也是构成细胞膜的成分，与细胞的识别和表面抗原性有关。

4、萜类和类固醇类

这两类化合物都是异戊二烯（isoptene）的衍生物，都不含脂肪酸。

生物中主要的萜类化合物有胡萝卜素和维生素 A、E、K 等。还有一种多萜醇磷酸酯，它是细胞质中糖基转移酶的载体。

类固醇类（steroids）化合物又称甾类化合物，其中胆固醇是构成膜的成分。另一些甾类化合物是激素类，如雌性激素、雄性激素、肾上腺激素等。

三、酶与生物催化剂

（一）酶

酶是蛋白质性的催化剂，主要作用是降低化学反应的活化能，增加了反应物分子越过活化能屏障和完成反应的概率。酶的作用机制是，在反应中酶与底物暂时结合，形成了酶——底物活化复合物。这种复合物对活化能的需求量低，因而在单位时间内复合物分子越过活化能屏障的数量就比单纯分子要多。反应完成后，酶分子迅即从酶——底物复合物中解脱出来。

酶的主要特点是：具有高效催化能力、高度特异性和可调性；要求适宜的 pH 和温度；只催化热力学允许的反应，对正负反应的均具有催化能力，实质上是能加速反应达到平衡的速度。

某些酶需要有一种非蛋白质性的辅因子（cofactor）结合才能具有活性。辅因子可以是一种复杂的有机分子，也可以是一种金属离子，或者二者兼有。完全的蛋白质——辅因子复合物称为全酶（holoenzyme）。全酶去掉辅因子，剩下的蛋白质部分称为脱辅基酶蛋白（apoenzyme）。

（二）RNA 催化剂

T.Cech 1982 发现四膜虫（*Tetrahymena*）rRNA 的前体物能在没有任何蛋白质参与下进行自我加工，产生成熟的 rRNA 产物。这种加工方式称为自我剪接（self

splicing）。后来又发现，这种剪下来的 RNA 内含子序列像酶一样，也具有催化活性。此 RNA 序列长约 400 个核苷酸，可褶叠成表面复杂的结构。它也能与另一 RNA 分子结合，将其在一定位点切割开，因而将这种具有催化活性的 RNA 序列称为核酶 Ribozyme。后来陆续发现，具有催化活性的 RNA 不只存在于四膜虫，而是普遍存在于原核和真核生物中。一个典型的例子核糖体的肽基转移酶，过去一直认为催化肽链合成的是核糖体中蛋白质的作用，但事实上具有肽基转移酶活性和催化形成肽键的成分是 RNA，而不是蛋白质，核糖体中的蛋白质只起支架作用。

第四章 质膜及其表面结构

质膜（plasma membrane）包在细胞外面，所以又称细胞膜（cell membrane），它不仅是区分细胞内部与周围环境的动态屏障，更是细胞物质交换和信息传递的通道。围绕各种细胞器的膜，称为细胞内膜。质膜和内膜在起源、结构和化学组成的等方面具有相似性，故总称为生物膜（biomembrane）。生物膜是细胞进行生命活动的重要物质基础，细胞的能量转换、蛋白质合成、物质运输、信息传递、细胞运动等活动都与膜的作用有密切的关系。

质膜表面寡糖链形成细胞外被（cell coat）或糖萼（glycocalyx）；质膜下的表层溶胶中具有细胞骨架成分组成的网络结构，除对质膜有支持作用外，还与维持质膜的功能有关，所以这部分细胞骨架又称为膜骨架。细胞外被、质膜和表层胞质溶胶构成细胞表面。

第一节 质膜的化学组成

质膜主要由膜脂和膜蛋白组成，另外还有少量糖，主要以糖脂和糖蛋白的形式存在。膜脂是膜的基本骨架，膜蛋白是膜功能的主要体现者。动物细胞膜通常含有等量的脂类和蛋白质。

一、膜脂

膜脂主要包括磷脂、糖脂和胆固醇三种类型。

(一)、磷脂

是构成膜脂的基本成分，约占整个膜脂的 50%以上。磷脂分子的主要特征：

具有一个极性头和两个非极性的尾（脂肪酸链，图 4-1），但存在于线粒体内膜和某些细菌质膜上的心磷脂具有 4 个非极性的区域（图 4-2）。

脂肪酸碳链为偶数，多数碳

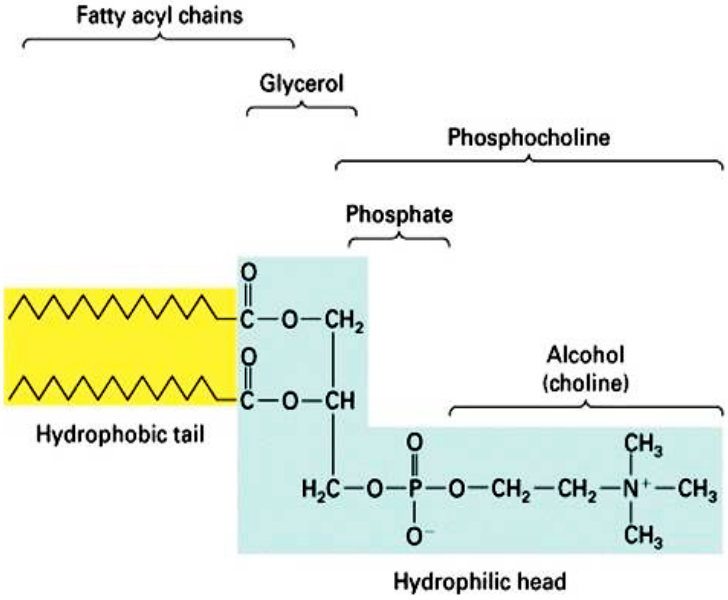


图 4-1 磷脂的结构

链由 16，18 或 20 个碳原子组成。常含有不饱和脂肪酸（如油酸）。

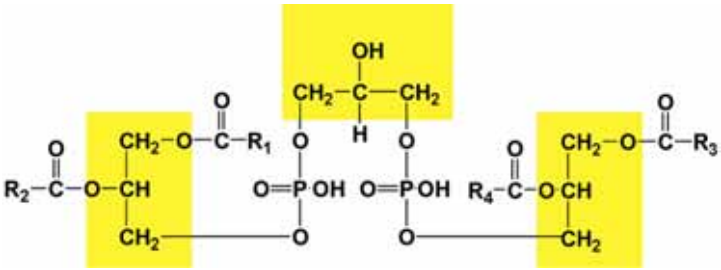


图 4-2 心磷脂

1、甘油磷脂

以甘油为骨架的磷脂类，在骨架上结合两个脂肪酸链和一个磷酸基团，胆碱、乙醇胺、丝氨酸或肌醇等分子籍磷酸基团连接到脂分子上(图 4-3)。

主要类型有：磷脂酰胆碱（phosphatidyl choline，PC，旧称卵磷脂）、磷脂酰丝氨酸（phosphatidyl serine，PS）、磷脂酰乙醇胺（phosphatidyl ethanolamine ，PE，旧称脑磷脂）磷脂酰肌醇（phosphatidyl inositol，PI）和双磷脂酰甘油（DPG，旧称心磷脂）等。

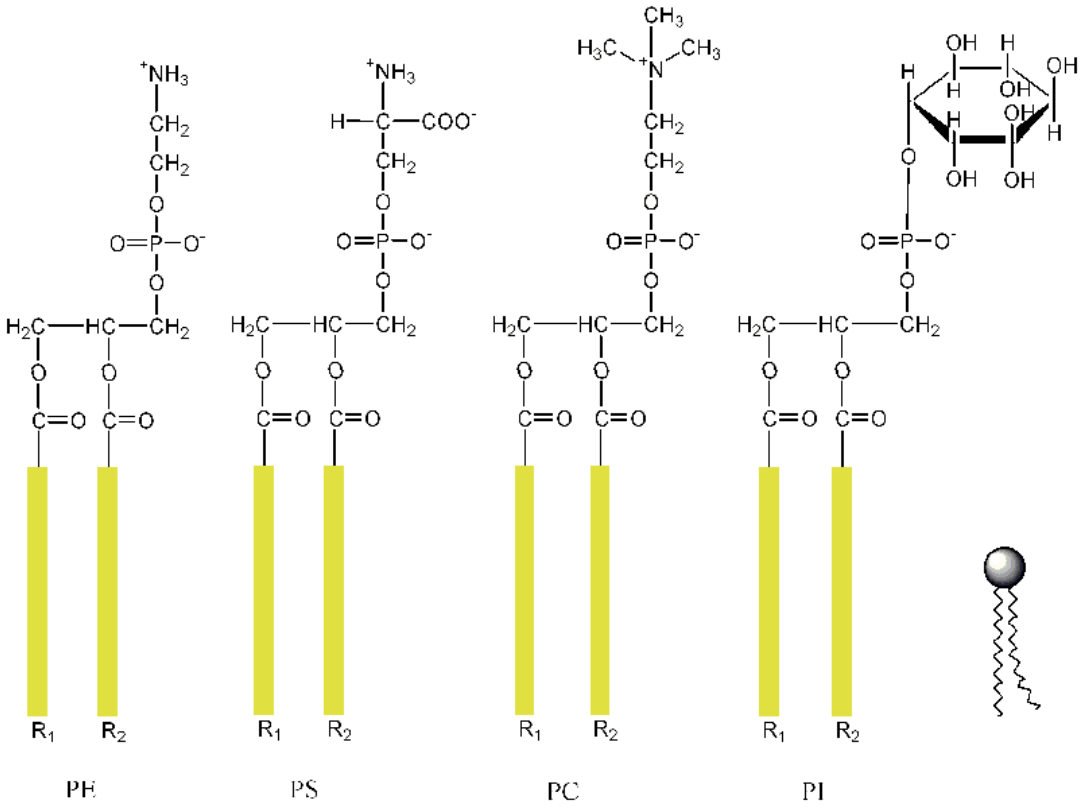


图 4-3 不同类型的甘油磷脂

2、鞘磷脂

鞘磷脂（Sphngomydins，SM，图 4-4）在脑和神经细胞膜中特别丰富，亦称神经醇磷脂，它是以鞘胺醇（Sphingoine）为骨架，与一条脂肪酸链组成疏水尾部，亲水头部也含胆碱与磷酸结合。原核细胞和植物中没有鞘磷脂。

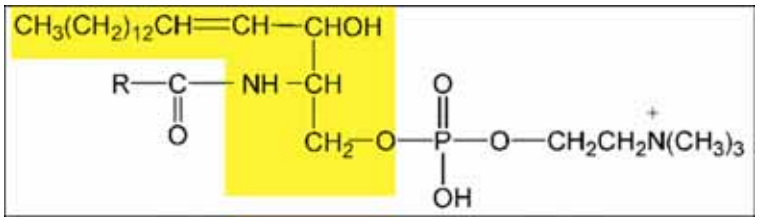


图 4-4 鞘磷脂

（二）、糖脂

糖脂(图 4-5、4-6)是含糖而不含磷酸的脂类，普遍存在于原核和真核细胞的质膜上，其含量约占膜脂总量的 5%以下，在神经细胞膜上糖脂含量较高，约占 5-10%。糖脂也是两性分子。其结构与 SM 很相似，只是由一个或多个糖残基代替了磷脂酰胆碱而与鞘氨醇的羟基结合。

最简单的糖脂是半乳糖脑苷脂，它只有一个半乳糖残基作为极性头部，在髓鞘的多层膜中含量丰富；变化最多、最复杂的糖脂是神经节苷脂，其头部包含一个或几个唾液酸和糖的残基。神经节苷脂是神经元质膜中具有特征性的成分。儿童所患的家族性白痴病（Tay-sachs disease）就是因为在其细胞内缺乏氨基己糖脂酶，不能将神经节苷脂 GM_2 加工成为 GM_3，结果大量的 GM_2 累积在神经细胞中，导致中枢神经系统退化。神经节苷脂本身就是一类膜上的受体，已知破伤风毒素、霍乱毒素、干扰素、促甲状腺素、绒毛膜促性腺激素和 5-羟色胺等的受体就是不同的神经节苷脂。

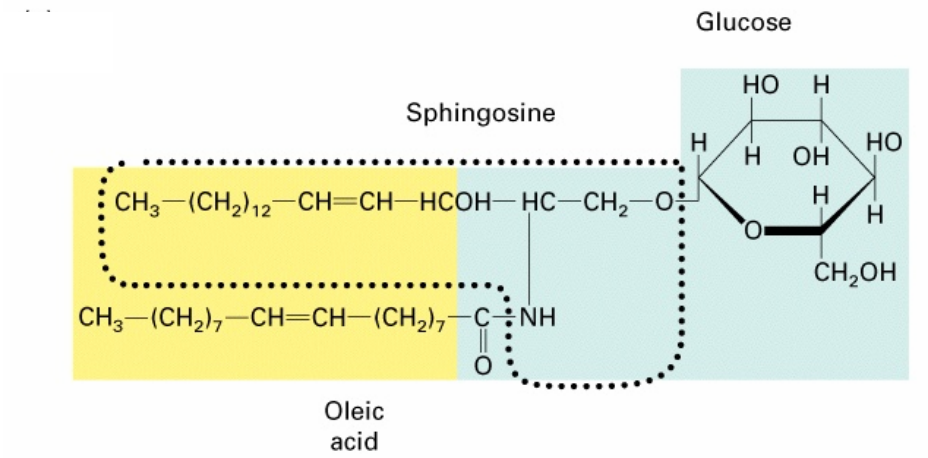


图 4-5 葡糖脑苷脂

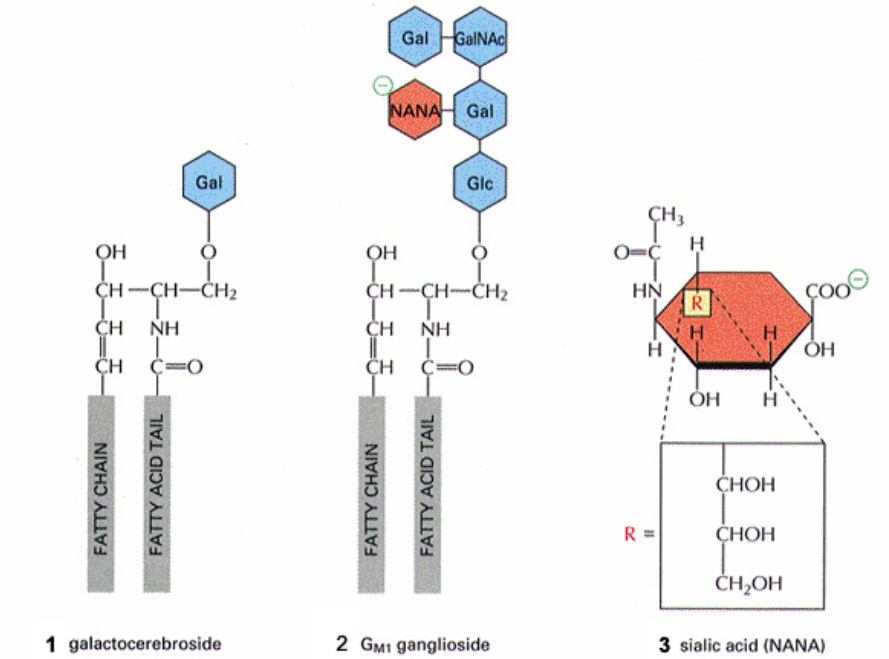


图 4-6 糖脂的结构 1. 半乳糖脑苷脂，2. GM1 神经节苷脂，3. 唾液酸

（三）、胆固醇

胆固醇(图 4-7)仅存在真核细胞膜上，含量一般不超过膜脂的 1/3，植物细胞膜中含量较少，其功能是提高脂双层的力学稳定性，调节脂双层流动性，降低水溶性物质的通透性。如：在缺少胆固醇培养基中，不能合成胆固醇的突变细胞株很快发生自溶。

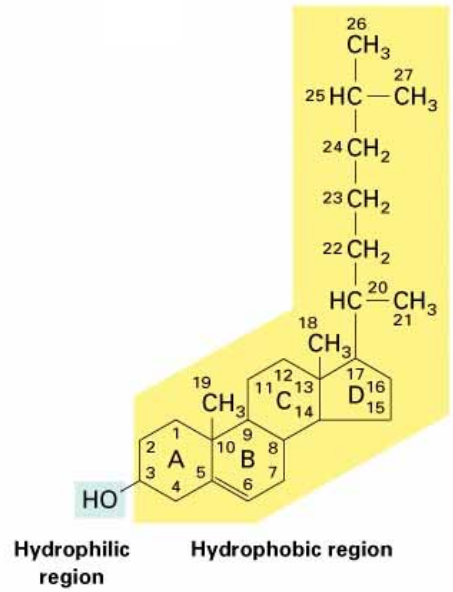
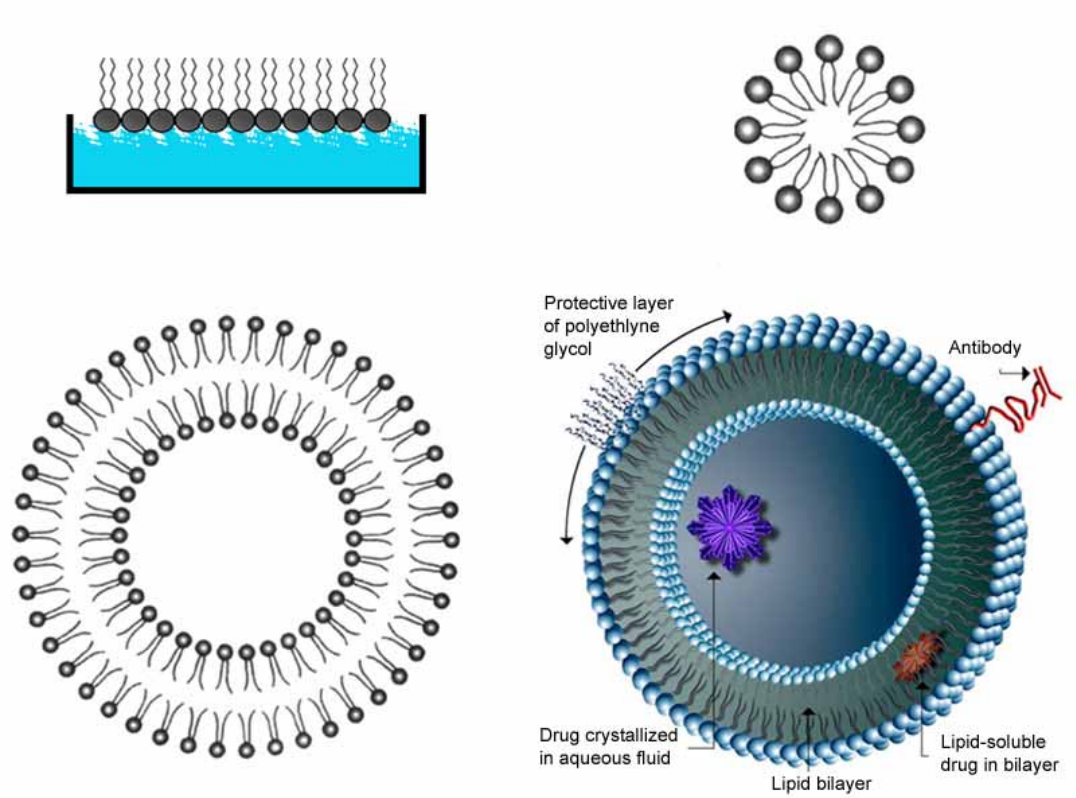


图 4-7 胆固醇

（四）、脂质体

脂质体（liposome）是一种人工膜。在水中磷脂分子亲水头部插入水中，疏水尾部伸向空气，搅动后形成双层脂分子的球形脂质体，直径 25~1000nm 不等。脂质体可用于转基因，或制备的药物，利用脂质体可以和细胞膜融合的特点，将药物送入细胞内部。



。

图 4-8 脂质体 （根据 Gerald Karp 2002 修改）

二、膜蛋白

膜蛋白是膜功能的主要体现者。据估计核基因组编码的蛋白质中 30%左右的为膜蛋白。根据膜蛋白与脂分子的结合方式，可分为整合蛋白（integral protein）、外周蛋白（peripheral protein）和脂锚定蛋白（lipid-anchored protein）。

整合蛋白可能全为跨膜蛋白（tansmembrane proteins），为两性分子，疏水部分位于脂双层内部，亲水部分位于脂双层外部。由于存在疏水结构域，整合蛋白与膜的结合非常紧密，只有用去垢剂（detergent）才能从膜上洗涤下来，如离子型去垢剂 SDS(图 4-9)，非离子型去垢剂 Triton-X100(图 4-10)。

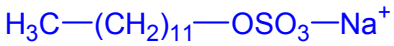


图 4-9 十二烷基磺酸钠

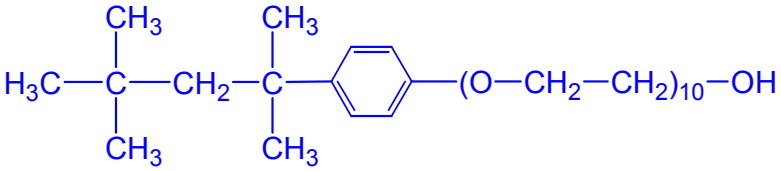


图 4-10 Triton-X100

整合蛋白的跨膜结构域可以是 1 至多个疏水的 α 螺旋，形成亲水通道的整合蛋白跨膜区域有两种组成形式，一是由多个两性 α 螺旋组成亲水通道；而是由两性 β 折叠组成亲水通道(图 4-11)。

外周蛋白靠离子键或其它较弱的键与膜表面的蛋白质分子或脂分子的亲水部分结合，因此只要改变溶液的离子强度甚至提高温度就可以从膜上分离下来，有时很难区分整合蛋白和外周蛋白，主要是因为一个蛋白质可以由多个亚基构成，有的亚基为跨膜蛋白，有的则结合在膜的外部。

脂锚定蛋白（lipid-anchored protein）可以分为两类，一类是糖磷脂酰肌醇(glycophosphatidylinositol，GPI)锚定蛋白，GPI 位于细胞膜的外小叶，用磷脂酶 C（能识别含肌醇的磷脂）处理细胞，能释放出结合的蛋白。许多细胞表面的受体、酶、细胞粘附分子和引起羊瘙痒病的 PrP^C 都是这类蛋白。另一类脂锚定蛋白与插入质膜内小叶的长碳氢链结合。

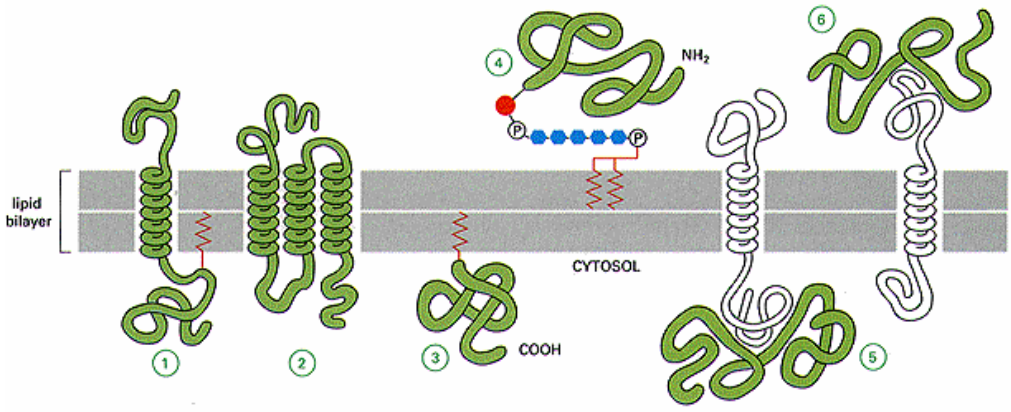


图 4-11 蛋白与膜的结合方式

①、②整合蛋白；③、④脂锚定蛋白；⑤、⑥外周蛋白

第二节 质膜的结构

一、质膜结构的研究历史

1. E. Overton 1895 发现凡是溶于脂肪的物质很容易透过植物的细胞膜，而不

溶于脂肪的物质不易透过细胞膜，因此推测细胞膜由连续的脂类物质组成。

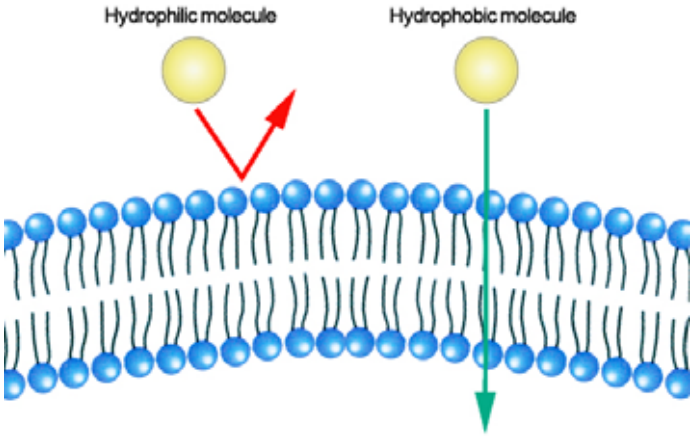


图 4-12 水溶性物质难以通过质膜

2. E. Gorter & F. Grendel 1925 用有机溶剂提取了人类红细胞质膜的脂类成分，将其铺展在水面，测出膜脂展开的面积二倍于细胞表面积，因而推测细胞膜由双层脂分子组成。

3. J. Danielli & H. Davson 1935 发现质膜的表面张力比油－水界面的张力低得多，推测膜中含有蛋白质，从而提出了"蛋白质-脂类-蛋白质"的三明治模型。认为质膜由双层脂类分子及其内外表面附着的蛋白质构成的。1959 年在上述基础上提出了修正模型，认为膜上还具有贯穿脂双层的蛋白质通道，供亲水物质通过。

4. J. D. Robertson 1959 用超薄切片技术获得了清晰的细胞膜照片，显示暗-明-暗三层结构(图 4-13)，厚约 7.5nm。这就是所谓的"单位膜"模型。它由厚约 3.5nm 的双层脂分子和内外表面各厚约 2nm 的蛋白质构成。单位膜模型的不足之处在于把膜的动态结构描写成静止的不变的。

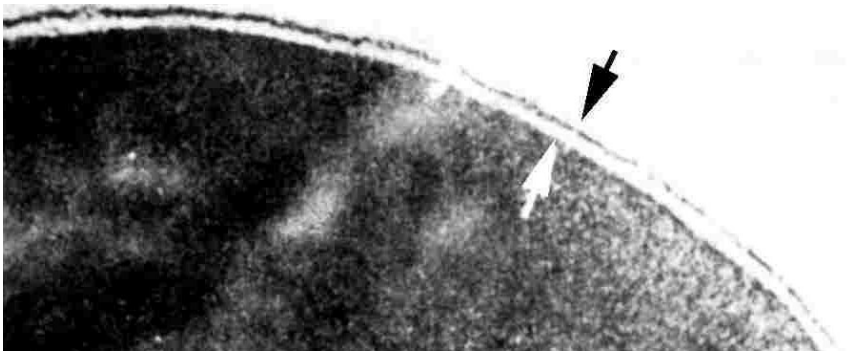


图 4-13 红细胞膜的结构

5. S. J. Singer & G. Nicolson 1972 根据免疫荧光技术、冰冻蚀刻技术的研究结果，在"单位膜"模型的基础上提出"流动镶嵌模型"。强调膜的流动性和膜蛋白分布的不对称性。

二、质膜的流动镶嵌模型

流动镶嵌模型突出了膜的流动性和不对称性，认为细胞膜由流动的脂双层和嵌

在其中的蛋白质组成。磷脂分子以疏水性尾部相对，极性头部朝向水相组成生物膜骨架，蛋白质或嵌在脂双层表面，或嵌在其内部，或横跨整个脂双层，表现出分布的不对称性(图 4-14)。

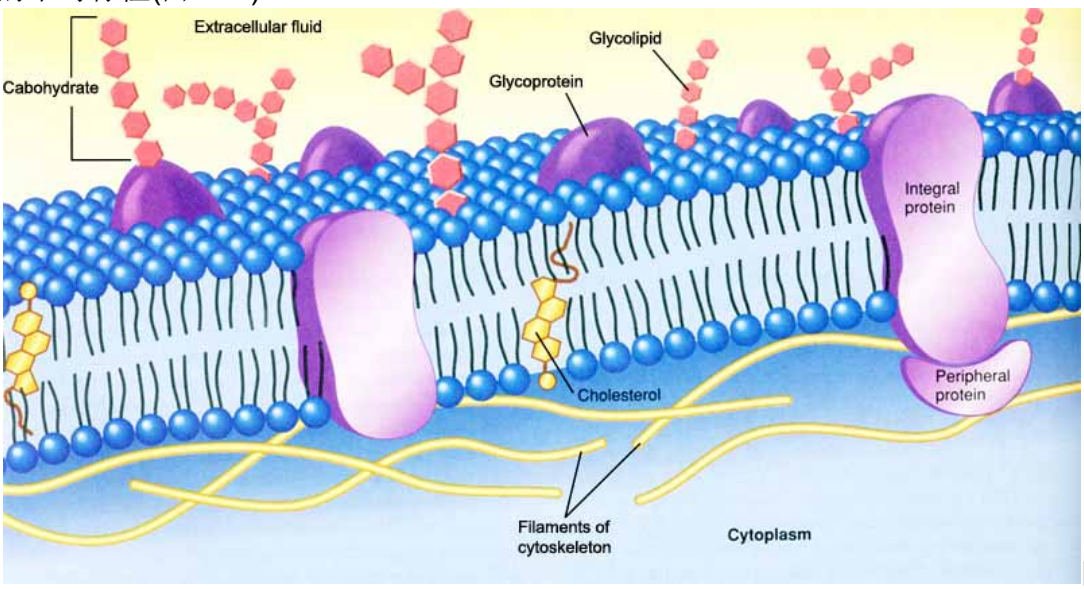


图 4-14 质膜的的结构模型

（一）质膜的流动性

质膜的流动性由膜脂和蛋白质的分子运动两个方面组成。

1．膜脂分子的运动

1. 侧向扩散：同一平面上相邻的脂分子交换位置（图 4-15）。
2. 旋转运动：膜脂分子围绕与膜平面垂直的轴进行快速旋转。
3. 摆动运动：膜脂分子围绕与膜平面垂直的轴进行左右摆动。
4. 伸缩震荡：脂肪酸链沿着与纵轴进行伸缩震荡运动。
5. 翻转运动：膜脂分子从脂双层的一层翻转到另一层。是在翻转酶（flippase）的催化下完成。
6. 旋转异构：脂肪酸链围绕 C-C 键旋转，导致异构化运动。

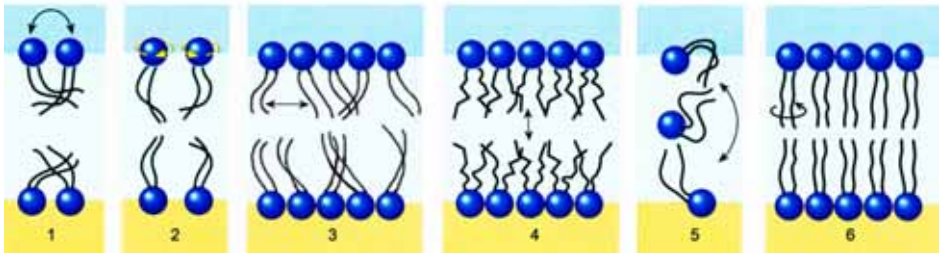


图 4-15 膜脂的分子运动

2．影响膜流动性的因素

影响膜流动的因素主要来自膜本身的组分，遗传因子及环境因子等。包括：

1. 胆固醇：胆固醇的含量增加会降低膜的流动性。
2. 脂肪酸链的饱和度：脂肪酸链所含双键越多越不饱和，使膜流动性增加。
3. 脂肪酸链的链长：长链脂肪酸相变温度高，膜流动性降低。
4. 卵磷脂/鞘磷脂：该比例高则膜流动性增加，是因为鞘磷脂粘度高于卵磷脂。
5. 其他因素：膜蛋白和膜脂的结合方式、温度、酸碱度、离子强度等。

3．膜蛋白的分子运动

主要有侧向扩散和旋转扩散两种运动方式。可用光脱色恢复技术（fluorescence recovery after photobleaching，FRAP）和细胞融合技术[9]（图 4-16）检测侧向扩散。旋转扩散指膜蛋白围绕与膜平面垂直的轴进行旋转运动，膜蛋白的侧向运动受细胞骨架的限制，破坏微丝的药物如细胞松弛素 B 能促进膜蛋白的侧向运动。

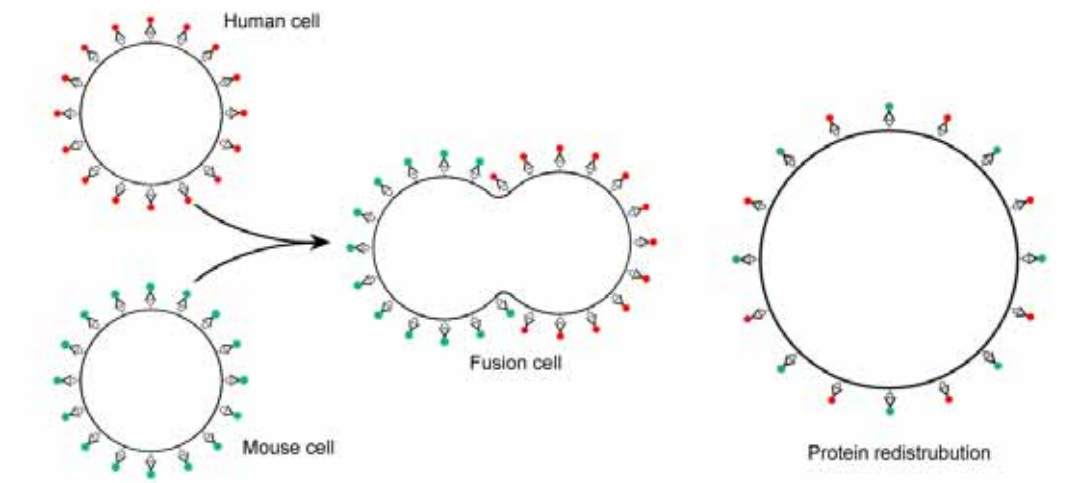


图 4-16 利用细胞融合技术观察蛋白质运动

4．膜流动性的生理意义

质膜的流动性是保证其正常功能的必要条件。例如跨膜物质运输、细胞信息传递、细胞识别、细胞免疫、细胞分化以及激素的作用等等都与膜的流动性密切相关。当膜的流动性低于一定的阈值时，许多酶的活动和跨膜运输将停止，反之如果流动

[9]用荧光标记的抗体与细胞膜上的抗原反应，使细胞膜带有荧光，用紫外线照射，使一侧细胞的荧光淬灭，放置一段时间后会发现荧光物质又均匀分布在细胞表面。
1970 年 Larry Frye 等人将人和和鼠的细胞膜用不同荧光抗体标记后，让两种细胞融合，杂种细胞一半发红色荧光、另一半发绿色荧光，放置一段时间后发现两种荧光抗体均匀分布。

性过高，又会造成膜的溶解。

（二）膜的不对称性

质膜的内外两层的组分和功能有明显的差异，称为膜的不对称性。膜脂、膜蛋白和复合糖在膜上均呈不对称分布，导致膜功能的不对称性和方向性，即膜内外两层的流动性不同，使物质传递有一定方向，信号的接受和传递也有一定方向等。

样品经冰冻断裂处理后，细胞膜往往从脂双层中央断开，为了便于研究，各部分都有固定的名称（图 4-17）：ES，质膜的细胞外表面（extrocytopasmic surface）；PS，质膜的原生质表面（protoplasmic surface）；EF（extrocytopasmic face），质膜的细胞外小页断裂面；PF（protoplasmic face），原生质小页断裂面。

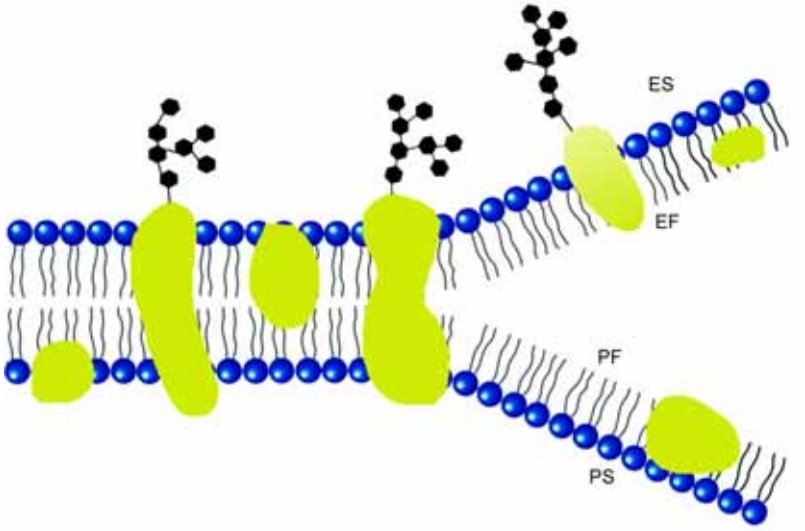


图 4-17 膜各个断面的名称

1．膜脂的不对称性：

脂分子在脂双层中呈不均匀分布，质膜的内外两侧分布的磷脂的含量比例也不同。PC 和 SM 主要分布在外小页，而 PE 和 PS 主要分布在质膜内小叶。用磷脂酶处理完整的人类红细胞，80%的 PC 降解，而 PE 和 PS 分别只有 20%和 10%的被降解。

膜脂的不对称性还表现在膜表面具有胆固醇和鞘磷脂等形成的微结构域——脂筏，详见下文。

2．膜蛋白的不对称性

膜蛋白的不对称性是指每种膜蛋白分子在细胞膜上都具有明确的方向性和分布的区域性。各种膜蛋白在膜上都有特定的分布区域。

某些膜蛋白只有在特定膜脂存在时才能发挥其功能，如：蛋白激酶 C 结合于膜的内侧，需要磷脂酰丝氨酸的存在下才能发挥作用；线粒体内膜的细胞色素氧化酶，需要心磷脂存在才具活性。

3．复合糖的不对称性

无论在任何情况下，糖脂和糖蛋白只分布于细胞膜的外表面，这些成分可能是细胞表面受体，并且与细胞的抗原性有关。

三、脂筏

脂筏（lipid raft）是质膜上富含胆固醇和鞘磷脂的微结构域（microdomain）。大小约 70nm 左右，是一种动态结构，位于质膜的外小页。由于鞘磷脂具有较长的饱和脂肪酸链，分子间的作用力较强，所以这些区域结构致密，介于无序液体与液晶之间，称为有序液体（Liquid-ordered）。在低温下这些区域能抵抗非离子去垢剂的抽提，所以又称为抗去垢剂膜（detergent-resistant membranes，DRMs）。脂筏就像一个蛋白质停泊的平台，与膜的信号转导、蛋白质分选均有密切的关系。

从脂筏的角度来看，膜蛋白可以分为三类：①存在于脂筏中的蛋白质；包括糖磷脂酰肌醇锚定蛋白（GPI anchored protein），某些跨膜蛋白，Hedgehog 蛋白，双乙酰化蛋白（doubly acylated protein）如：非受体酪氨酸激酶 Src、G 蛋白的 Gα 亚基、血管内皮细胞的一氧化氮合酶（NOS）；②存在于脂筏之外无序液相的蛋白质；③介于两者之间的蛋白质，如某些蛋白在没有接受到配体时，对脂筏的亲和力低，当结合配体，发生寡聚化时就会转移到脂筏中。

脂筏中的胆固醇就像胶水一样，它对具有饱和脂肪酸链的鞘磷脂亲和力很高，而对不饱和脂肪酸链的亲和力低，用甲基-β-环糊精（methyl-β-cyclodextrin）去除胆固醇，抗去垢剂的蛋白就变得易于提取。膜中的鞘磷脂主要位于外小页，而且大部分都参与形成脂筏。

据估计脂筏的面积可能占膜表面积的一半以上。脂筏的大小是可以调节的，小的独立脂筏可能在保持信号蛋白呈关闭状态方面具有重要作用，当必要时，这些小的脂筏聚集成大一个大的平台，在那里信号分子（如受体）将和它们的配件相遇，启动信号传递途径。如致敏原（allergen）能够将过敏患者体内肥大细胞或嗜碱性细胞表面的IgE抗体及其受体桥联起来，形成较大的脂筏，受体被脂筏中的Lyn（一种非受体酪氨酸激酶)磷酸化，启动下游的信号转导，最终引发过敏反应。

细胞表面的穴样内陷（caveolae）具有和脂筏一样的膜脂组成，不含笼形蛋白（clathrin），含有caveolin（一种小分子量的蛋白，21KD）。大量存在于脂肪细胞、上皮细胞和平滑肌细胞。这种结构细胞的内吞有关，另外穴样内陷中还富含某些信号分子，说明它与细胞的信号转导有关。

四、细胞膜的功能

细胞质膜的主要功能概括如下：

1. 为细胞的生命活动提供相对稳定的内环境；
2. 选择性的物质运输，包括代谢底物的输入与代谢产物的排出；
3. 提供细胞识别位点，并完成细胞内外信息的跨膜传递；
4. 为多种酶提供结合位点，使酶促反应高效而有序地进行；
5. 介导细胞与细胞、细胞与基质之间的连接；
6. 参与形成具有不同功能的细胞表面特化结构。

第三节 细胞表面的分化

细胞表面的特化结构如：膜骨架、鞭毛和纤毛、微绒毛及细胞的变形足等等，分别与细胞形态的维持、细胞运动、细胞的物质交换等功能有关。

一、细胞外被

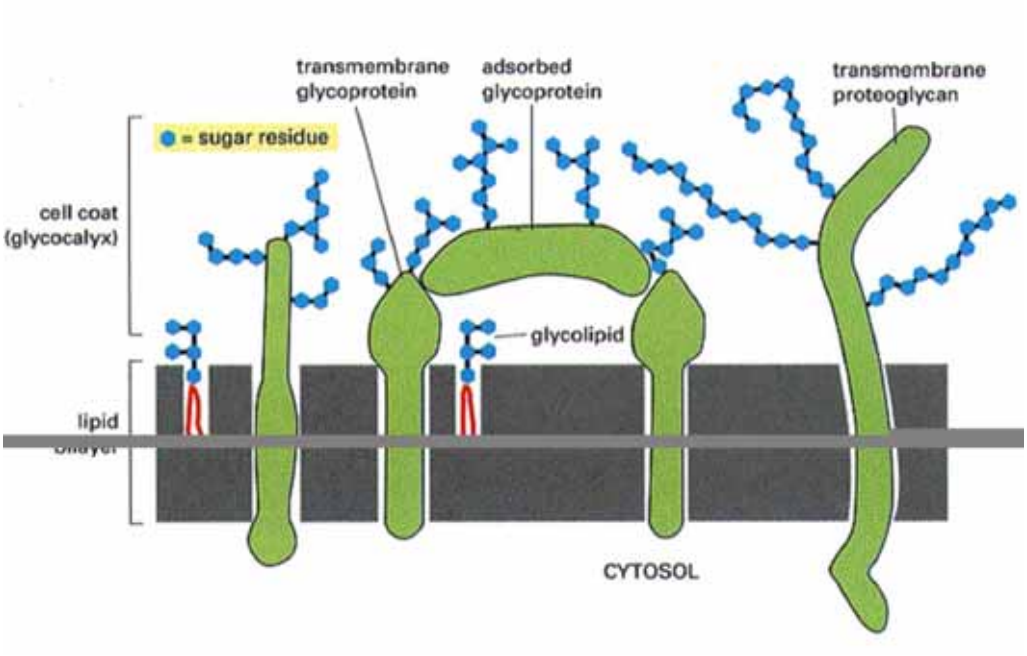


图 4-18 糖链构成细胞外被

动物细胞表面存在着一层富含糖类物质的结构，称为细胞外被（cell coat）或糖萼（glycocalyx）。用重金属染料如：钌红染色后，在电镜下可显示厚约 10~20nm 的结构，边界不甚明确。细胞外被是由构成质膜的糖蛋白和糖脂伸出的寡糖链组成

的，实质上是质膜结构的一部分(图 4-18)。

细胞外被的作用有：

1、保护作用：细胞外被具有一定的保护作用，去掉细胞外被，并不会直接损伤质膜。

2、细胞识别：细胞识别与构成细胞外被的寡糖链密切相关。寡糖链由质膜糖蛋白和糖脂伸出，每种细胞寡糖链的单糖残基具有一定的排列顺序，编成了细胞表面的密码，它是细胞的"指纹"，为细胞的识别形成了分子基础。同时细胞表面尚有寡糖的专一受体，对具有一定序列的寡糖链具有识别作用。因此，细胞识别实质上是分子识别。Townes 和 Holtfreter（1955）把两栖类动物的原肠胚 3 个胚层的细胞分散后，混合培养，结果 3 个胚层的细胞均自行分类聚集，分别参加其来源胚层的组建。如果将鸡胚细胞和小鼠胚细胞分散后相混培养，各种细胞仍按来源组织分别聚集，但相聚细胞只具有组织的专一性，而没有物种的分辨能力。

3、决定血型：血型实质上是不同的红细胞表面抗原，人有 20 几种血型，最基本的血型是 AB0 血型。红细胞质膜上的糖鞘脂是 AB0 血型系统的血型抗原，血型免疫活性特异性的分子基础是糖链的糖基组成。A、B、O 三种血型抗原的糖链结构基本相同，只是糖链末端的糖基有所不同。A 型血的糖链末端为 N-乙酰半乳糖；B 型血为半乳糖；AB 型两种糖基都有，O 型血则缺少这两种糖基。

二、膜骨架

膜骨架指质膜下与膜蛋白相连的由纤维蛋白组成的网架结构(meshwork)，它参与维持质膜的形状并协助质膜完成多种生理功能。膜骨架位于细胞质膜下约 0.2μm 厚的溶胶层。

成熟的动物血红细胞没有细胞核、细胞器和内膜系统，是研究膜骨架的理想材料。红细胞经低渗处理，细胞破裂释放出内容物，留下一个保持原形的空壳，称为血影（ghost, 图 4-19）。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析分析结果表明，血影蛋白主要成分包括：血影蛋白（spectrin）、锚蛋白（ankyrin）、带 4.2 蛋白（band 4.2）、带 4.1 蛋白（band 4.1）、短肌动蛋白（short actin）和血型糖蛋白（glycophorin）。血影蛋白和肌动蛋白是外周蛋白，去除后血影的形状变得不规则，膜蛋白的流动性增强。血型糖蛋白和带 3 蛋白为整合蛋白，经 TritonX-100 处理，此二带消失但血影仍维持原来的形状。

血影蛋白：由结构相似的 α 链、β 链组成一个异二聚体，两个二聚体头与头相接连形成一四聚体。

锚蛋白（ankyrin）：与血影蛋白和带 3 蛋白的胞质部相连，将血影蛋白网络连接到质膜上。

带三蛋白：是阴离子载体，通过交换 Cl^-，使 HCO^-_3 进入红细胞。为二聚体。每个单体含 929 个氨基酸，穿膜 12 次。

血型糖蛋白：单次穿膜糖蛋白，约有 131 个氨基酸， N 端在膜外侧，结合 16 条寡糖链；C-端在胞质面，链较短，与带 4.1 蛋白相连。血型糖蛋白与 MN 血型有关，其功能尚不明确。

血影蛋白四聚体游离端与短肌动蛋白纤维（约 13~15 单体）相连，形成血影蛋白网络。并通过带 4.1 蛋白与血型糖蛋白连结，通过锚蛋白与带 3 蛋白相连。这一骨架系统赋与了红细胞质膜的刚性与韧性，得以几百万次地通过比它直径还小的微血管、动脉、静脉。至于红细胞的双凹型可能还与肌球蛋白的作用有关。

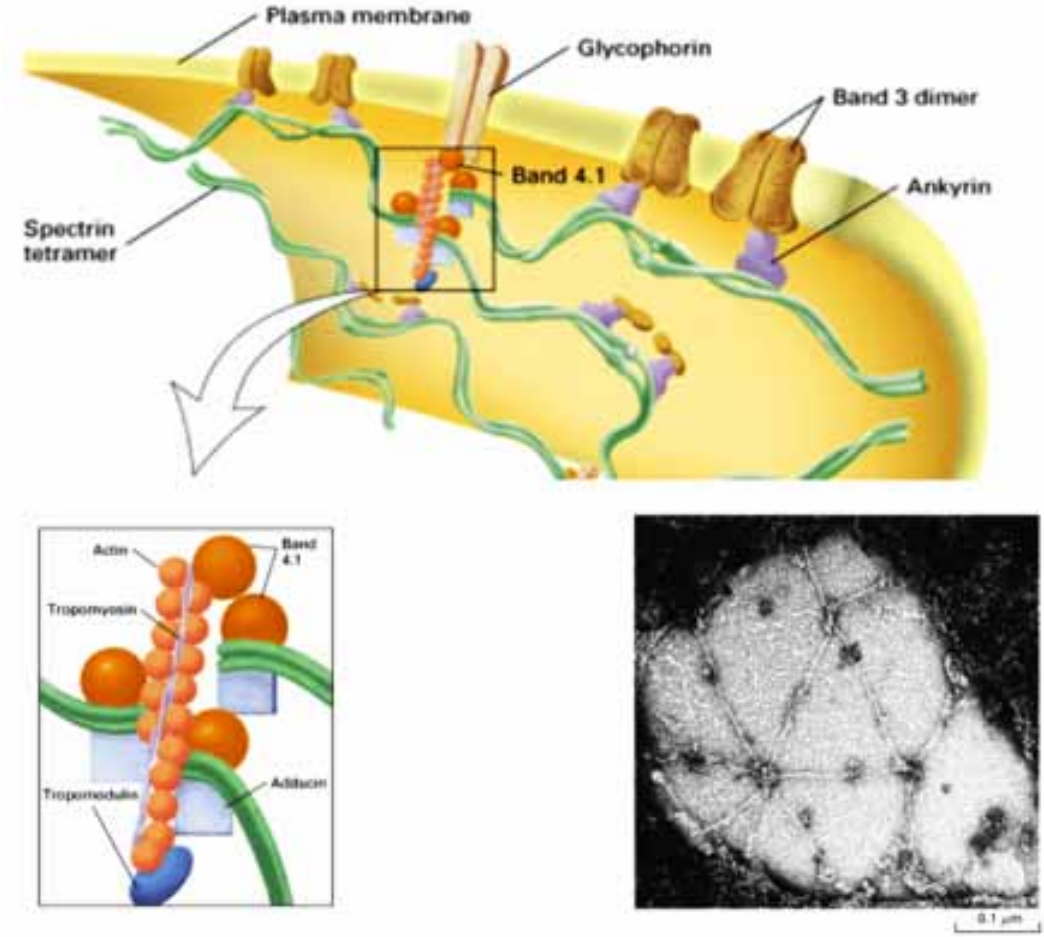


图 4-19 红细胞膜骨架的网络结构

三、质膜的特化结构

质膜常带有许多特化的附属结构。这些特化结构在细胞执行特定功能方面具有重要意义，在电镜下观察到。

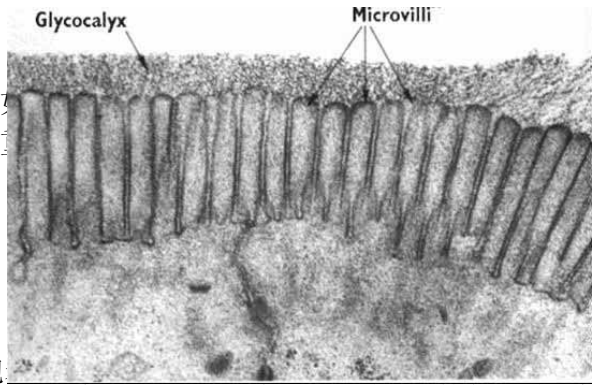


图 4- 20 糖萼与微绒毛

（一）微绒毛

微绒毛（microvilli，图 4-20）是细胞表面的细胞表面。微绒毛直径约为 0.1μm。长度

小肠上皮细胞刷状缘中的微绒毛，长度约为 0.6~0.8μm。微绒毛的内芯由肌动蛋白丝束组成，肌动蛋白丝之间由许多微绒毛蛋白（villin）和丝束蛋白（fimbrin）组成的横桥相连。微绒毛侧面质膜有侧臂与肌动蛋白丝束相连，从而将肌动蛋白丝束固定。

微绒毛的存在扩大了细胞的表面积，有利于细胞同外环境的物质交换。如小肠上的微绒毛，使细胞的表面积扩大了 30 倍，大大有利于大量吸收营养物质。不论微绒毛的长度还是数量，都与细胞的代谢强度有着相应的关系。例如肿瘤细胞，对葡萄糖和氨基酸的需求量都很大，因而大都带有大量的微绒毛。

（二）皱褶

在细胞表面还有一种扁形突起，称为皱褶（ruffle）或片足（lamellipodia）。皱褶在形态上不同于微绒毛，它宽而扁，宽度不等，厚度与微绒毛直径相等，约 0.1μm，高达几微米。在巨噬细胞的表面上，普遍存在着皱褶结构，与吞噬颗粒物质有关(图 4-21)。

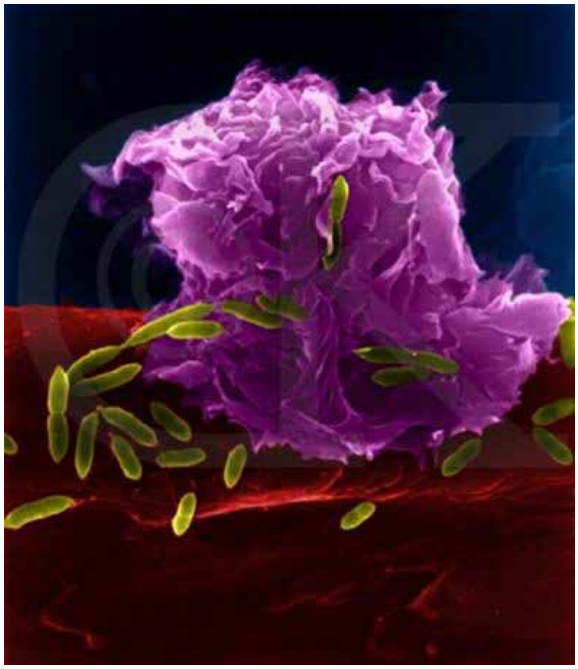


图 4- 21 巨噬细胞表面的皱褶

（三）内褶

内褶（infolding，图 4-22）是质膜由细胞表面内陷形成的结构，同样具有扩大了细胞表面积的作用。这种结构常见于液体和离子交换活动比较旺盛的细胞。

（四）纤毛和鞭毛

纤毛（cilia）和鞭毛（flagella）是细胞表面伸出的条状运动装置。二者在发生和结构上并没有什么差别，均由 9+2 微管构成（图 4-22）。有的细胞靠纤毛（如草履虫）或鞭毛（如精子和眼虫）在液体中穿行；有的细胞，如动物的某些上皮细胞，虽具有纤毛，但细胞本体不动，纤毛的摆动可推动物质越过细胞表面，进行物质运送，如气管和输卵管上皮细胞的表面纤毛。纤毛和鞭毛都来源于中心粒。关于纤毛和鞭毛的详细结构和功能可参见第八章细胞骨架。

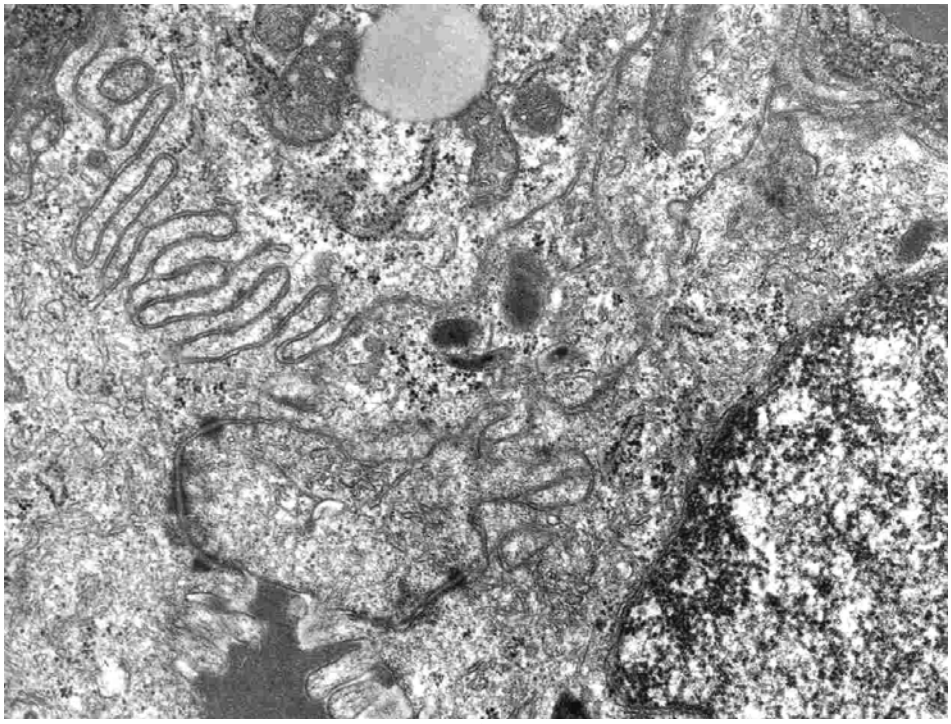


图 4-22 内褶

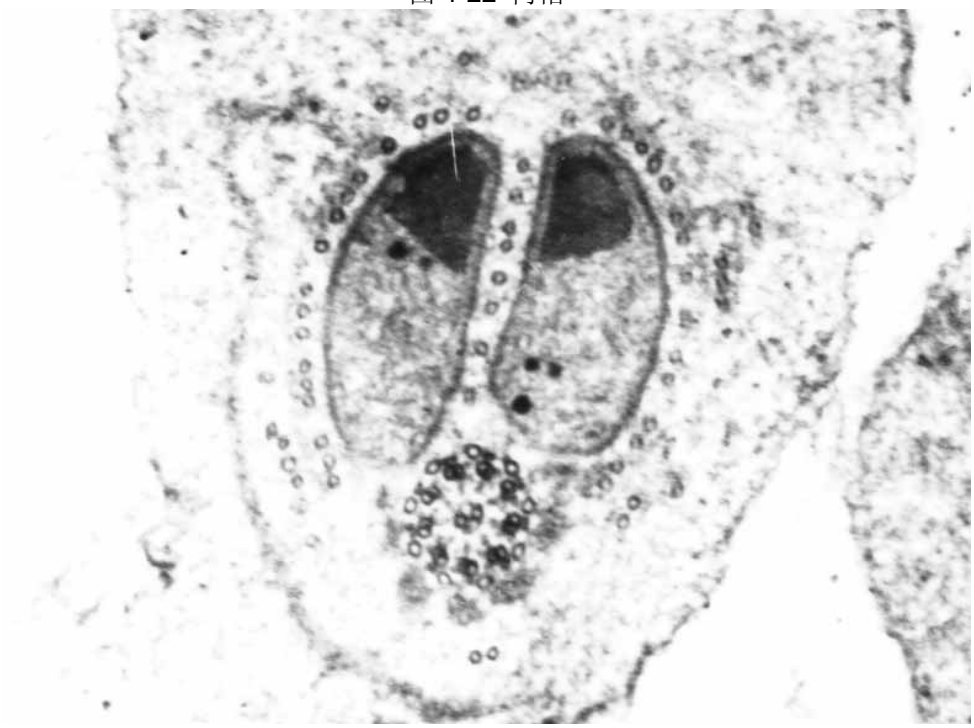


图 4-23 同翅目昆虫精子鞭毛横切（示 9+2 微管结构）

第五章 跨膜运输

细胞膜是防止细胞外物质自由进入细胞的屏障，它保证了细胞内环境的相对稳定，使各种生化反应能够有序运行。但是细胞必须与周围环境发生信息、物质与能量的交换，才能完成特定的生理功能。因此细胞必须具备一套物质转运体系，用来获得所需物质和排出代谢废物，据估计细胞膜上与物质转运有关的蛋白占核基因编码蛋白的 15~30%，细胞用在物质转运方面的能量达细胞总消耗能量的三分之二。

细胞膜上存在两类主要的转运蛋白，即：载体蛋白（carrier protein）和通道蛋白（channel protein）。载体蛋白又称做载体（carrier）、通透酶（permease）和转运器（transporter），能够与特定溶质结合，通过自身构象的变化，将与它结合的溶质转移到膜的另一侧，载体蛋白有的需要能量驱动，如：各类 APT 驱动的离子泵；有的则不需要能量，以自由扩散的方式运输物质，如：缬氨酶素。通道蛋白与所转运物质的结合较弱，它能形成亲水的通道，当通道打开时能允许特定的溶质通过，所有通道蛋白均以自由扩散的方式运输溶质。

第一节 被动运输

一、简单扩散

也叫自由扩散（free diffusing），特点是：①沿浓度梯度（或电化学梯度）扩散；②不需要提供能量；③没有膜蛋白的协助。

某种物质对膜的通透性（P）可以根据它在油和水中的分配系数（K）及其扩散系数（D）来计算：

P=KD/t，t 为膜的厚度。

脂溶性越高通透性越大，水溶性越高通透性越小；非极性分子比极性容易透过，小分子比大分子容易透过。具有极性的水分子容易透过是因水分子小，可通过由膜脂运动而产生的间隙。

非极性的小分子如 O_2、CO_2、N_2 可以很快透过脂双层，不带电荷的极性小分子，如水、尿素、甘油等也可以透过人工脂双层，尽管速度较慢，分子量略大一点的葡萄糖、蔗糖则很难透过，而膜对带电荷的物质如：H^+、Na^+、K^+、Cl^-、HCO_3^- 是高度不通透的（图 5-1）。

事实上细胞的物质转运过程中，透过脂双层的简单扩散现象很少，绝大多数情况下，物质是通过载体或者通道来转运的。离子、葡萄糖、核苷酸等物质有的是通过质膜上的运输蛋白的协助，按浓度梯度扩散进入质膜的，有的则是通过主动运输的方式进行转运。

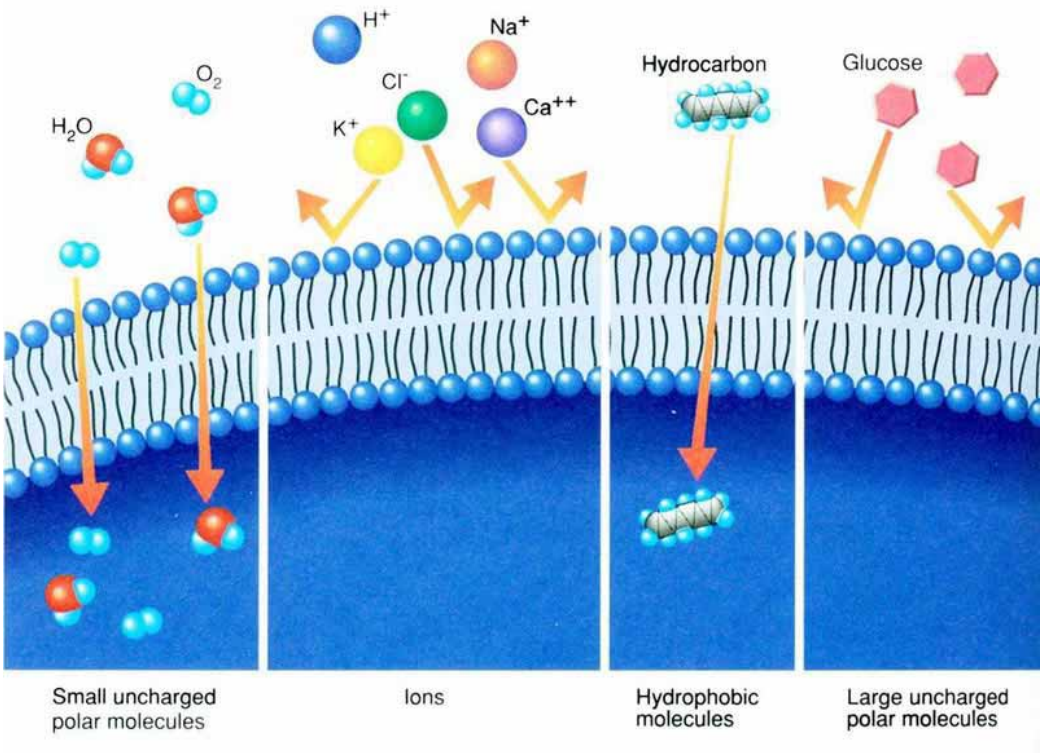


图 5-1 不同物质透过人工脂双层的能力

二、协助扩散

也称促进扩散（faciliatied diffusion），其运输特点是： ①比自由扩散转运速率高； ②存在最大转运速率； 在一定限度内运输速率同物质浓度成正比。如超过一定限度，浓度再增加，运输也不再增加。因膜上载体蛋白的结合位点已达饱和； ③有特异性，即与特定溶质结合。这类特殊的载体蛋白主要有离子载体和通道蛋白两种类型。

（一）离子载体

离子载体（ionophore），是疏水性的小分子，可溶于双脂层，提高所转运离子的通透率，多为微生物合成，是微生物防御被捕食或与其它物种竞争的武器，
离子载体也是以被动的运输方式运输离子，可分成可动离子载体（mobile ion carrier）和通道离子载体（channel former）两类：

可动离子载体：如缬氨霉素（valinomycin）能在膜的一侧结合 K^+，顺着电化学梯度通过脂双层，在膜的另一侧释放 K^+，且能往返进行（图 5-2）。其作用机理就像虹吸管可以使玻璃杯中的水跨越杯壁屏障，向低处流动一样。此外，2,4-二硝基酚（DNP）、羰基-氰-对-三氟甲氧基苯肼（FCCP）可转运 H^+，离子霉素（ionomycin）、A23187 可转运 Ca^{2+}。

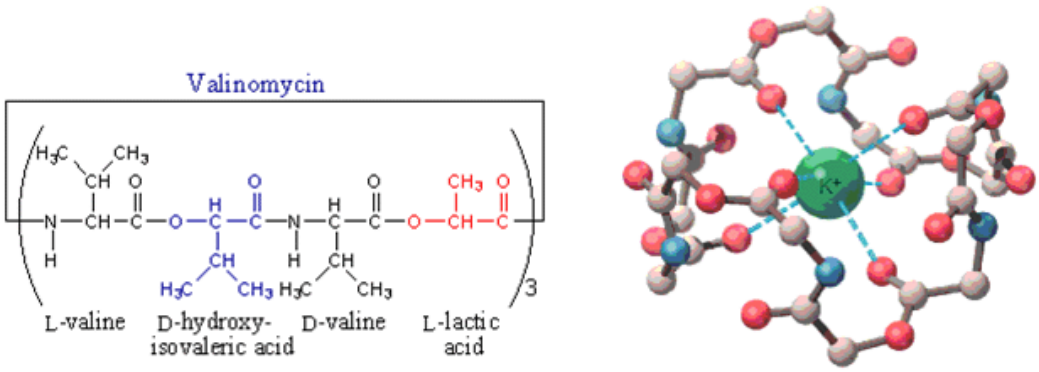


图 5-2 缬氨霉素的分子结构

通道离子载体：如短杆菌肽 A（granmicidin）是由 15 个疏水氨基酸构成的短肽，2 分子的短杆菌肽形成一个跨膜通道，有选择的使单价阳离子如 H^+、Na^+、K^+ 按化学梯度通过膜，这种通道并不稳定，不断形成和解体，其运输效率远高于可动离子载体（图 5-3）。

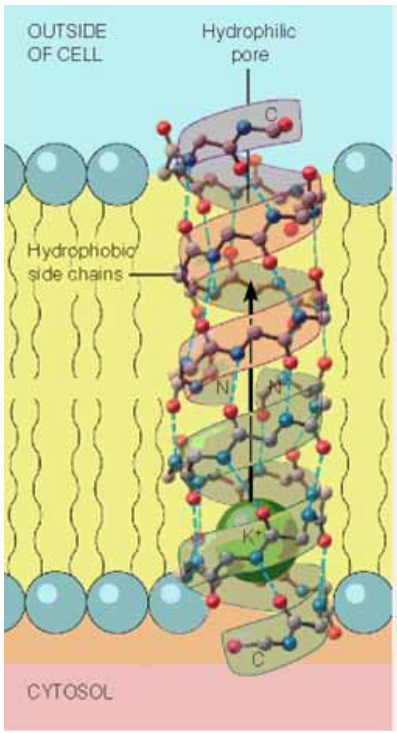


图 5-3 短杆菌肽构成的通道

（二）通道蛋白

通道蛋白（channel protein）是衡跨质膜的亲水性通道，允许适当大小的离子顺浓度梯度通过，故又称离子通道。有些通道蛋白形成的通道通常处于开放状态，如钾泄漏通道，允许钾离子不断外流。有些通道蛋白平时处于关闭状态，即“门”不是连续开放的，仅在特定刺激下才打开，而且是瞬时开放瞬时关闭，在几毫秒的时

间里，一些离子、代谢物或其他溶质顺着浓度梯度自由扩散通过细胞膜，这类通道蛋白又称为门通道（gated channel）。

门通道可以分为四类（图5-4）：配体门通道（ligand gated channel）、电位门通道（voltage gated channel）、环核苷酸门通道（Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels）和机械门通道（mechanosensitive channel）。

不同通道对不同离子的通透性不同，即离子选择性(ionic selectivity)。这是由通道的结构所决定的，只允许具有特定离子半径和电荷的离子通过。根据离子选择性的不同，通道可分为钠通道、钙通道、钾通道、氯通道等。但通道的离子选择性只是相对的而不是绝对的，比如，钠通道除主要对Na^+通透外，对NH_4^+也通透，甚至于对K^+也稍有通透。

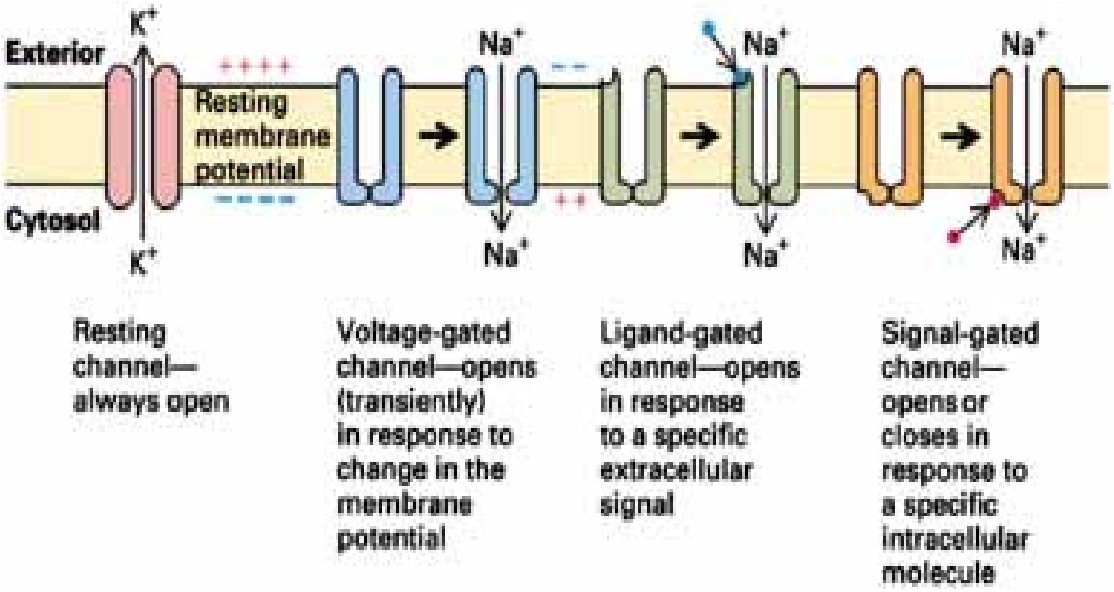


图 5-4 各类离子通道

1、配体门通道

表面受体与细胞外的特定物质（配体ligand）结合，引起门通道蛋白发生构象变化，结果使“门”打开，又称离子通道型受体。分为阳离子通道，如乙酰胆碱、谷氨酸和五羟色胺的受体，和阴离子通道，如甘氨酸和γ－氨基丁酸的受体。

N 型乙酰胆碱受体[10]是目前了解较多的一类配体门通道。它是由 4 种不同的亚单位组成的 5 聚体，总分子量约为 290kd。亚单位通过氢键等非共价键，形成一个结构为 α2βγδ 的梅花状通道样结构，其中的两个 α 亚单位是同两分子 Ach 相结合的部位（图 5-5）。

Ach 门通道具有具有三种状态：开启、关闭和失活。当受体的两个 α 亚单位结

[10]按照受体结构和对药物反应的不同，Ach 受体分为两大类：被毒蕈碱(Muscarine)激动的 Ach 受体称为毒蕈碱型 Ach 受体(M-AchR)，被烟碱(Nicotine)激动的 Ach 受体称为烟碱型 Ach 受体(N-AchR)，前者主要分布于副交感神经节后纤维和极少数交感神经节后纤维支配的效应器膜上，后者可分为神经型和肌肉型。

合 Ach 时，引起通道构象改变，通道瞬间开启，膜外 Na^+内流，膜内 K^+外流。使该处膜内外电位差接近于 0 值，形成终板电位，然后引起肌细胞动作电位，肌肉收缩。即是在结合 Ach 时，Ach 门通道也处于开启和关闭交替进行的状态，只不过开启的概率大一些（90%）。Ach 释放后，瞬间即被乙酰胆碱酯酶水解，通道在约 1 毫秒内关闭。如果 Ach 存在的时间过长（约 20 毫秒后），则通道会处于失活状态。

筒箭毒和 α 银环蛇毒素可与乙酰胆碱受体结合，但不能开启通道，导致肌肉麻痹。

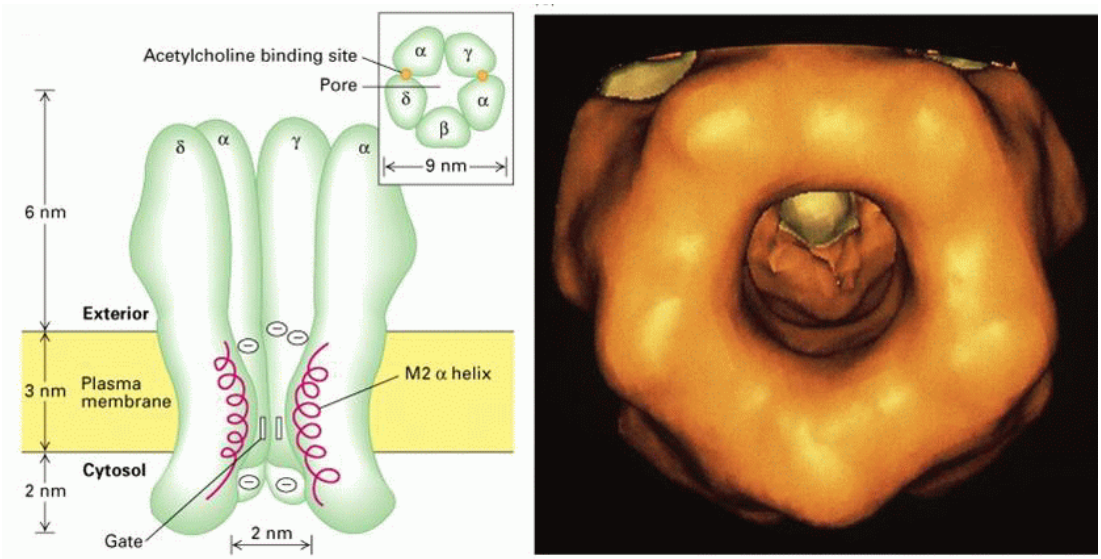


图 5-5 乙酰胆碱受体

2、电位门通道

电位门通道（voltage gated channel）是对细胞内或细胞外特异离子浓度发生变化时，或对其他刺激引起膜电位变化时，致使其构象变化，“门”打开。如：神经肌肉接点由 Ach 门控通道开放而出现终板电位时，这个电位改变可使相邻的肌细胞膜中存在的电位门 Na^+通道和 K^+通道相继激活（即通道开放），引起肌细胞动作电位；动作电位传至肌质网，Ca^{2+}通道打开引起 Ca^{2+}外流，引发肌肉收缩。

根据对Na^+、K^+、Ca^{2+}通道蛋白质的结构分析，发现它们一级结构中的氨基酸排列有相当大的同源性，属于同一蛋白质家族，是由同一个远祖基因演化而来。K^+电位门通道由四个α亚单位（I-IV）构成（图5-6），每个亚单位均有6个(S_1-S_6)跨膜α螺旋节段，N和C端均位于胞质面。连接S_5-S_6段的发夹样β折叠 (P区或H_5区)，构成通道的内衬，大小可允许K^+通过。

K^+通道具有三种状态：开启、关闭和失活。目前认为 S_4 段是电压感受器， S4 高度保守，属于疏水片段，但每隔两个疏水残基即有一个带正电荷的精氨酸或赖氨酸残基。S_4 段上的正电荷可能是门控电荷，当膜去极化时（膜外为负，膜内为正），引起带正电荷的氨基酸残基转向细胞外侧面，通道蛋白构象改变，“门”打开，大量K^+外流，此时相当于 K^+的自由扩散。K^+电位门它和 Ach 配体门一样只是瞬间（约几毫秒）开放，然后失活。此时 N 端的球形结构，堵塞在通道中央，通道失活，稍

后球体释放，“门”处于关闭状态。

链霉菌（*Streptomyces lividans*）的钾离子通道KcsA也是由四个亚单位构成的，但每个亚基只有两个跨膜片段，结构较为简单。1998年，Roderick MacKinnon 等用X射线衍射技术获得了高分辨的KcsA通道图像，发现离子通透过程中离子的选择性主要发生在狭窄的选择性过滤器中。选择性过滤器长1.2nm，孔径约为0.3nm（K^+脱水后直径约0.26nm），内部形成一串钾离子特异结合位点，从而只有钾离子能够“排队”通过通道。

河豚毒素（Tetrodotoxin，TTX）能阻滞钠通道，毒素带正电荷的胍基伸人钠通道的离子选择性过滤器，和通道内壁上的游离羧基结合，毒素其余部分堵塞通道外侧端，妨碍钠离子进入，导致肌肉麻痹。

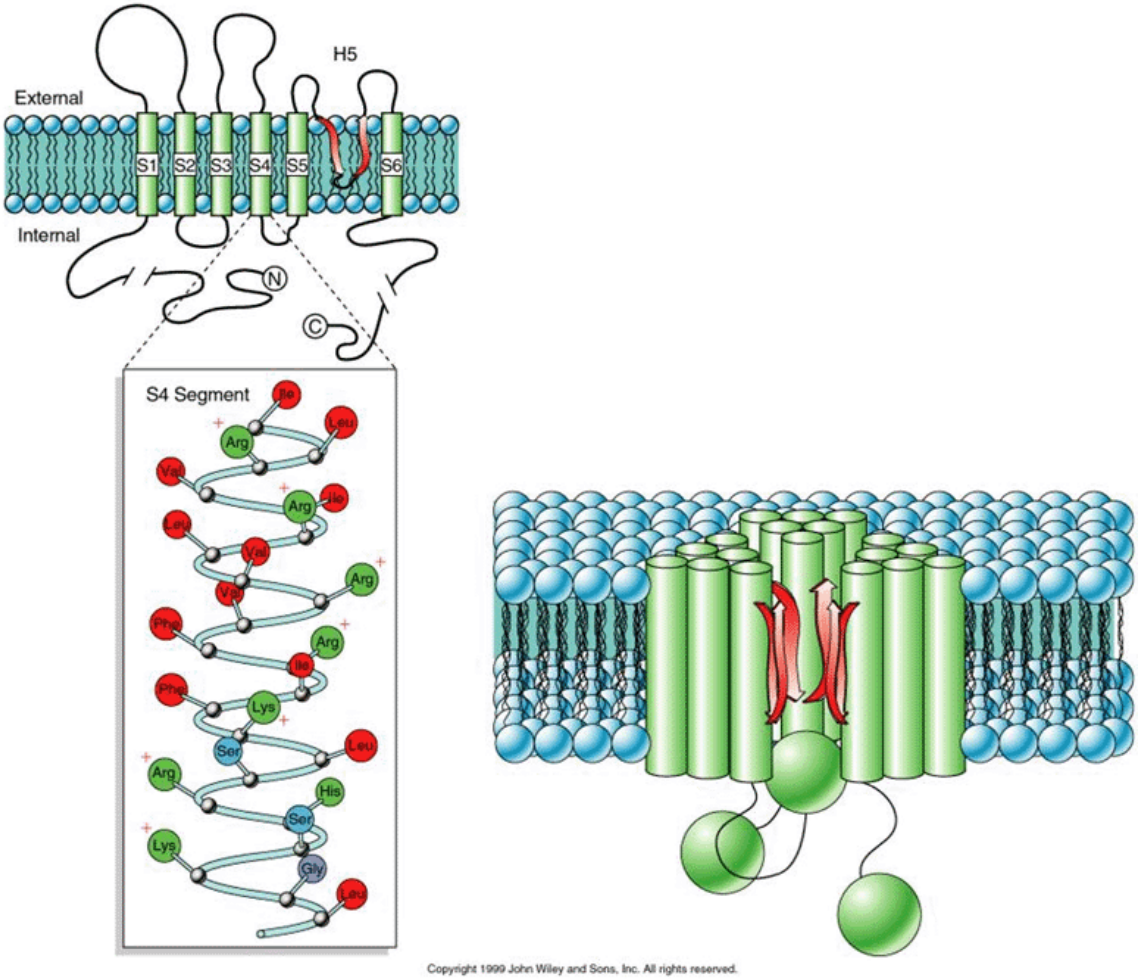


图 5-6 钾电位门通道

3、环核苷酸门通道

与电压门控性通道家族关系密切的是 CNG 通道，从蛋白质序列来看，它们与电压门钾通道结构相似，也有 6 个跨膜片段，各为带电荷片段，P 区构成孔道内侧，

整个通道为四聚体结构。在 CNG 通道中，细胞内的 C 末端较长，上面含有环核苷酸的结合位点。

环核苷酸门通道分布于化学感受器和光感受器中，与膜外信号的转换有关。如气味分子与化学感受器中的 G 蛋白偶联型受体结合，可激活腺苷酸环化酶，产生 cAMP，开启 cAMP 门控阳离子通道（cAMP-gated cation channel），引起钠离子内流，膜去极化，产生神经冲动，最终形成嗅觉或味觉。

4、机械门通道

细胞可以接受各种各样的机械力刺激，如摩擦力、压力、牵拉力、重力、剪切力等。细胞将机械刺激的信号转化为电化学信号最终引起细胞反应的过程称为机械信号转导（mechanotransduction）。

目前比较明确的有两类机械门通道，其一是牵拉活化或失活的离子通道，另一类是剪切力敏感的离子通道，前者几乎存在于所有的细胞膜，研究较多的有血管内皮细胞、心肌细胞以及内耳中的毛细胞等，后者仅发现于内皮细胞和心肌细胞。牵拉敏感的离子通道是指能直接被细胞膜牵拉所开放或关闭的离子通道。其特点为对离子的无选择性、无方向性、非线性以及无潜伏期。这种通道为 2 价或 1 价的阳离子通道，有 Na^+、K^+、Ca^{2+}，以 Ca^{2+}为主。研究表明，当内皮细胞被牵拉时，由于通道开放引起 Ca^{2+}内流，使以 Ca^{2+}介导的血管活性物质分泌增多，Ca^{2+}还可作为胞内信使，导致进一步的反应。

内耳毛细胞顶部的听毛也是对牵拉力敏感的感受装置，听毛弯曲时，毛细胞会出现暂短的感受器电位。从听毛受力而致听毛根部所在膜的变形，到该处膜出现跨膜离子移动之间，只有极短的潜伏期，

5、水通道

长期以来, 普遍认为细胞内外的水分子是以简单扩散的方式透过脂双层膜。后来发现某些细胞在低渗溶液中对水的通透性很高, 很难以简单扩散来解释。如将红细胞移入低渗溶液后，很快吸水膨胀而溶血，而水生动物的卵母细胞在低渗溶液不膨胀。因此，人们推测水的跨膜转运除了简单扩散外, 还存在某种特殊的机制, 并提出了水通道的概念。

1988 年 Agre 在分离纯化红细胞膜上的 Rh 血型抗原时，发现了一个 28 KD 的疏水性跨膜蛋白，称为 CHIP28 (Channel-Forming integral membrane protein)，1991 年得到 CHIP28 的 cDNA 序列，Agre 将 CHIP28 的 mRNA 注入非洲爪蟾的卵母细胞中，在低渗溶液中，卵母细胞迅速膨胀，并于 5 分钟内破裂，纯化的 CHIP28 置入脂质体，也会得到同样的结果。细胞的这种吸水膨胀现象会被 Hg^{2+}抑制，而这是已知的抑制水通透的处理措施。这一发现揭示了细胞膜上确实存在水通道，Agre 因此而与离子通道的研究者 Roderick MacKinnon 共享 2003 年的诺贝尔化学奖。

目前在人类细胞中已发现的此类蛋白至少有 11 种，被命名为水通道蛋白（Aquaporin，AQP），均具有选择性的让水分子通过的特性。在实验植物拟南芥

（*Arabidopsis thaliana*）中已发现 35 个这类水通道。

水通道的活性调节可能具有以下途径：通过磷酸化使 AQP 的活性增强；通过膜泡运输改变膜上 AQP 的含量，如血管加压素(抗利尿激素) 对肾脏远曲小管和集合小管上皮细胞水通透性调节；通过调节基因表达，促进 AQP 的合成。

第二节 主动运输

主动运输的特点是：①逆浓度梯度（逆化学梯度）运输；②需要能量（由 ATP 直接供能）或与释放能量的过程偶联（协同运输）；③都有载体蛋白。

主动运输所需的能量来源主要有：

1. 协同运输中的离子梯度动力；
2. ATP 驱动的泵通过水解 ATP 获得能量；
3. 光驱动的泵利用光能运输物质，见于细菌。

一、钠钾泵

实际上就是 Na^+-K^+ATP 酶（图 5-7），一般认为是由 2 个大亚基、2 个小亚基组成的 4 聚体。Na^+-K^+ATP 酶通过磷酸化和去磷酸化过程发生构象的变化，导致与 Na^+、K^+的亲和力发生变化。在膜内侧 Na^+与酶结合，激活 ATP 酶活性，使 ATP 分解，酶被磷酸化，构象发生变化，于是与 Na^+结合的部位转向膜外侧；这种磷酸化的酶对 Na^+的亲和力低，对 K^+的亲和力高，因而在膜外侧释放 Na^+、而与 K^+结合。K^+与磷酸化酶结合后促使酶去磷酸化，酶的构象恢复原状，于是与 K^+结合的部位转向膜内侧，K^+与酶的亲和力降低，使 K^+在膜内被释放，而又与 Na^+结合。其总的结果是每一循环消耗一个 ATP；转运出三个 Na^+，转进两个 K^+。

钠钾泵的一个特性是他对离子的转运循环依赖自磷酸化过程，ATP 上的一个磷酸基团转移到钠钾泵的一个天冬氨酸残基上，导致构象的变化。通过自磷酸化来转运离子的离子泵就叫做 P-type，与之相类似的还有钙泵和质子泵。它们组成了功能与结构相似的一个蛋白质家族。

Na^+-K^+泵作用是：①维持细胞的渗透性，保持细胞的体积；②维持低 Na^+高 K^+的细胞内环境，维持细胞的静息电位。

乌本苷（ouabain）、地高辛（digoxin）等强心剂能抑制心肌细胞 Na^+-K^+泵的活性；从而降低钠钙交换器效率，使内流钙离子增多，加强心肌收缩，因而具有强心作用。

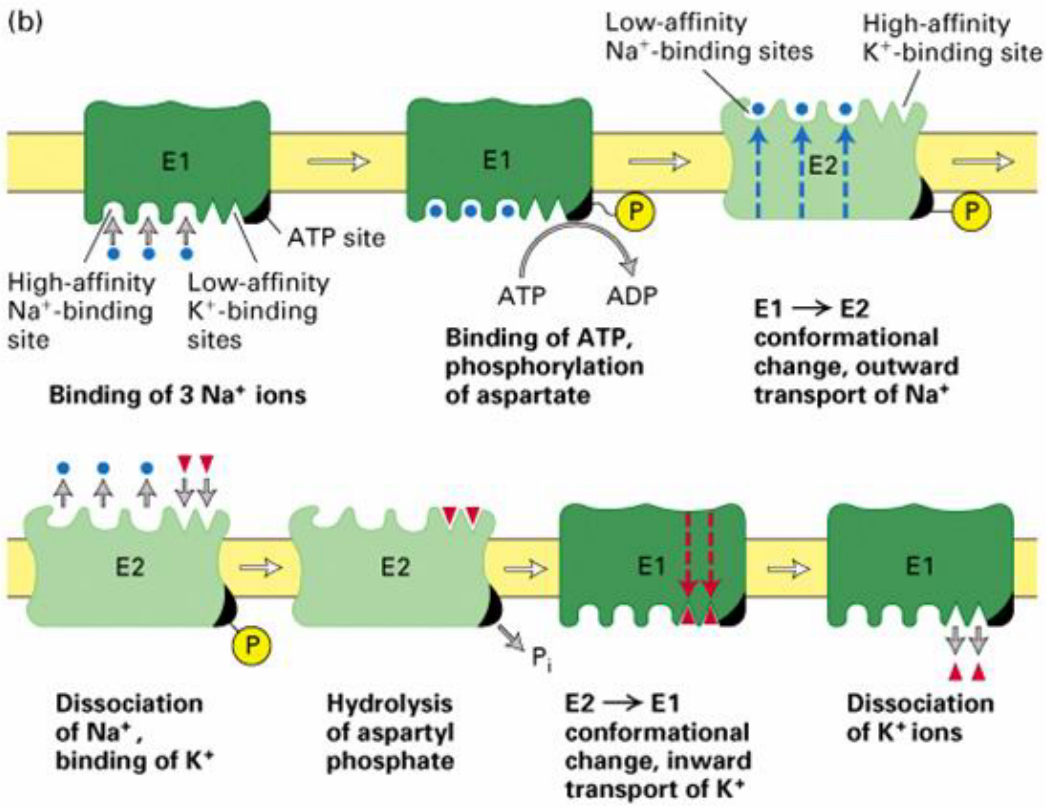


图 5-7 钠钾泵

二、钙离子泵

钙离子泵对于细胞是非常重要的，因为钙离子通常与信号转到有关，钙离子浓度的变化会引起细胞内信号途径的反应，导致一系列的生理变化。通常细胞内钙离子浓度（10^{-7}M）显著低于细胞外钙离子浓度（10^{-3}M），主要是因为质膜和内质网膜上存在钙离子转运体系，细胞内钙离子泵有两类：其一是 P 型离子泵（图 5-8），其原理与钠钾泵相似，每分解一个 ATP 分子，泵出 2 个 Ca^{2+}。另一类叫做钠钙交换器（Na^{+}-Ca^{2+} exchanger），属于反向协同运输体系（antiporter），通过钠钙交换来转运钙离子。

位于肌质网（sarcoplasmic reticulum）上的钙离子泵是了解最多的一类 P 型离子泵，占肌质网膜蛋白质的 90%。肌质网是一类特化的内质网，形成网管状结构位于细胞质中，具有贮存钙离子的功能。肌细胞膜去极化后引起肌质网上的钙离子通道打开，大量钙离子进入细胞质，引起肌肉收缩之后由钙离子泵将钙离子泵回肌质网。

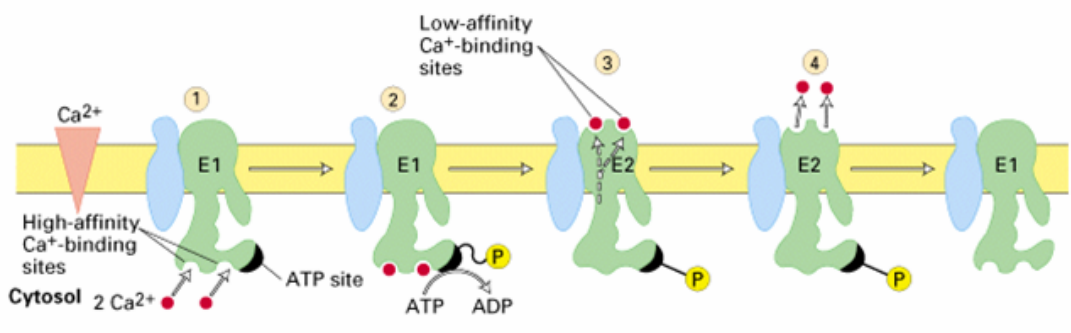


图 5-8 钙离子泵

三、质子泵

质子泵有三类（图 5-9）：P-type、V-type、F-type。

1、P-type：载体蛋白利用 ATP 使自身磷酸化（phosphorylation），发生构象的改变来转移质子或其它离子，如植物细胞膜上的 H^+泵、动物细胞的 Na^+-K^+泵、Ca^{2+}离子泵，H^+-K^+ATP 酶（位于胃表皮细胞，分泌胃酸）。

2、V-type：位于小泡（vacuole）的膜上，由许多亚基构成，水解 ATP 产生能量，但不发生自磷酸化，位于溶酶体膜、动物细胞的内吞体、高尔基体的囊泡膜、植物液泡膜上。

3、F-type：是由许多亚基构成的管状结构，H^+沿浓度梯度运动，所释放的能量与 ATP 合成耦联起来，所以也叫 ATP 合酶（ATP synthase），F 是氧化磷酸化或光合磷酸化偶联因子（factor）的缩写。F 型质子泵位于细菌质膜，线粒体内膜和叶绿体的类囊体膜上，其详细结构将在线粒体与叶绿体一章讲解。F 型质子泵不仅可以利用质子动力势将 ADP 转化成 ATP，也可以利用水解 ATP 释放的能量转移质子。

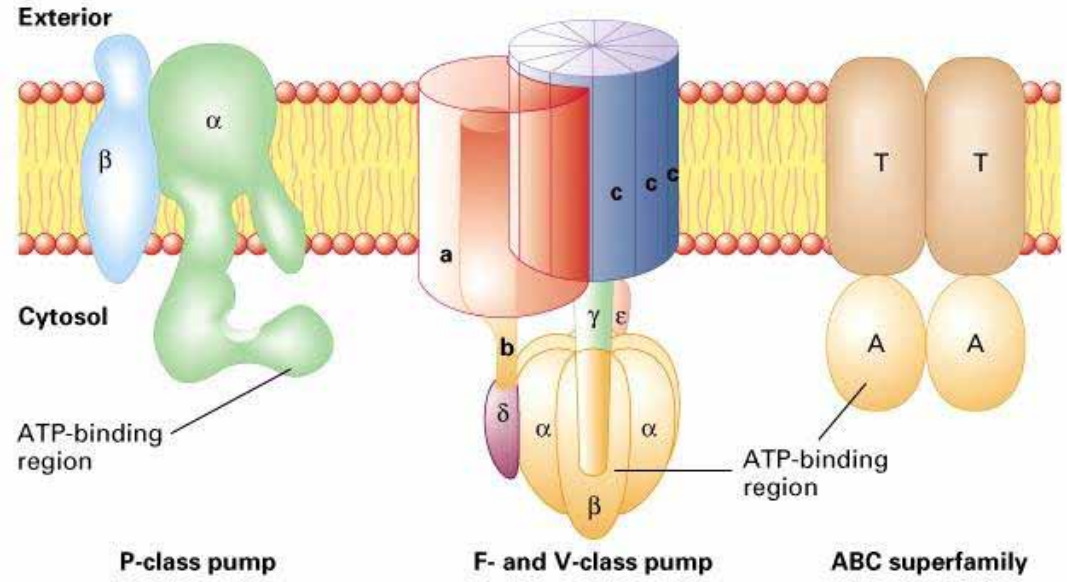


图 5-9 四种 ATP 驱动的离子泵

四、ABC 转运器

ABC 转运器（ABC transporter）最早发现于细菌，是细菌质膜上的一种运输 ATP 酶（transport ATPase），属于一个庞大而多样的蛋白家族，每个成员都含有两个高度保守的 ATP 结合区（ATP binding cassette），故名 ABC 转运器（图 5-10），他们通过结合 ATP 发生二聚化，ATP 水解后解聚，通过构象的改变将与之结合的底物转移至膜的另一侧。

在大肠杆菌中 78 个基因（占全部基因的 5%）编码 ABC 转运器蛋白，在动物中可能更多。虽然每一种 ABC 转运器只转运一种或一类底物，但是其蛋白家族中具有能转运离子、氨基酸、核苷酸、多糖、多肽、甚至蛋白质的成员。ABC 转运器还可催化脂双层的脂类在两层之间翻转，这在膜的发生和功能维护上具有重要的意义。

第一个被发现的真核细胞的 ABC 转运器是多药抗性蛋白（multidrug resistance protein, MDR），该基因通常在肝癌患者的癌细胞中过表达，降低了化学治疗的疗效。约 40%的患者的癌细胞内该基因过度表达。

ABC 转运器还与病原体对药物的抗性有关，如临床常用的抗真菌药物有氟康唑 、酮康唑、伊曲康唑等，真菌对这些药物产生耐药性的一个重要机制是通过 MDR 蛋白降低了细胞内的药物浓度。

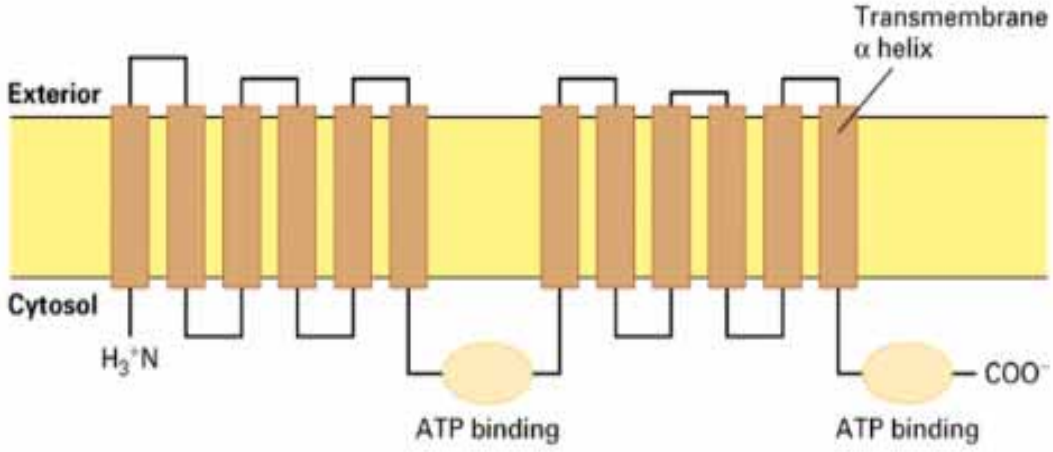


图 5-10 ABC 转运器

五、协同运输

协同运输（cotransport）是一类靠间接提供能量完成的主动运输方式。物质跨膜运动所需要的能量来自膜两侧离子的电化学浓度梯度，而维持这种电化学势的是钠钾泵或质子泵。动物细胞中常常利用膜两侧 Na^+浓度梯度来驱动，植物细胞和细菌常利用 H^+浓度梯度来驱动。根据物质运输方向与离子沿浓度梯度的转移方向，协同运输又可分为：同向协同（symport）与反向协同（antiport）。

1、同向协同

同向协同（symport）指物质运输方向与离子转移方向相同。如动物小肠细胞对对葡萄糖的吸收就是伴随着 Na^+的进入，细胞内的 Na^+离子又被钠钾泵泵出细胞外，细胞内始终保持较低的钠离子浓度，形成电化学梯度（图 5-11）。在某些细菌中，乳糖的吸收伴随着 H^+的进入，每转移一个 H^+吸收一个乳糖分子。

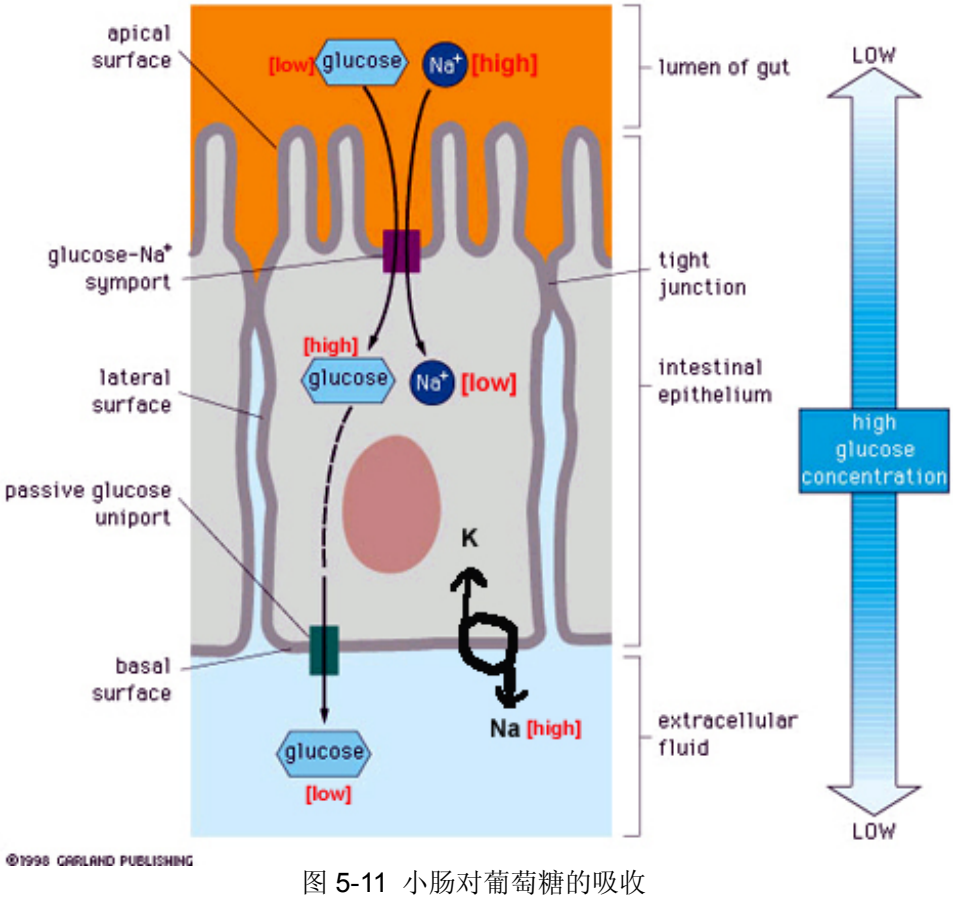


图 5-11 小肠对葡萄糖的吸收

2、反向协同

反向协同（antiport）物质跨膜运动的方向与离子转移的方向相反（图 5-12），如动物细胞常通过 Na^+/H^+反向协同运输的方式来转运 H^+以调节细胞内的 PH 值，即 Na^+的进入胞内伴随着 H^+的排出。此外质子泵可直接利用 ATP 运输 H^+来调节细胞 PH 值。

还有一种机制是 Na^+驱动的 Cl^--HCO_3^-交换，即 Na^+与 HCO_3^-的进入伴随着 Cl^-和 H^+的外流，如红细胞膜上的带 3 蛋白。

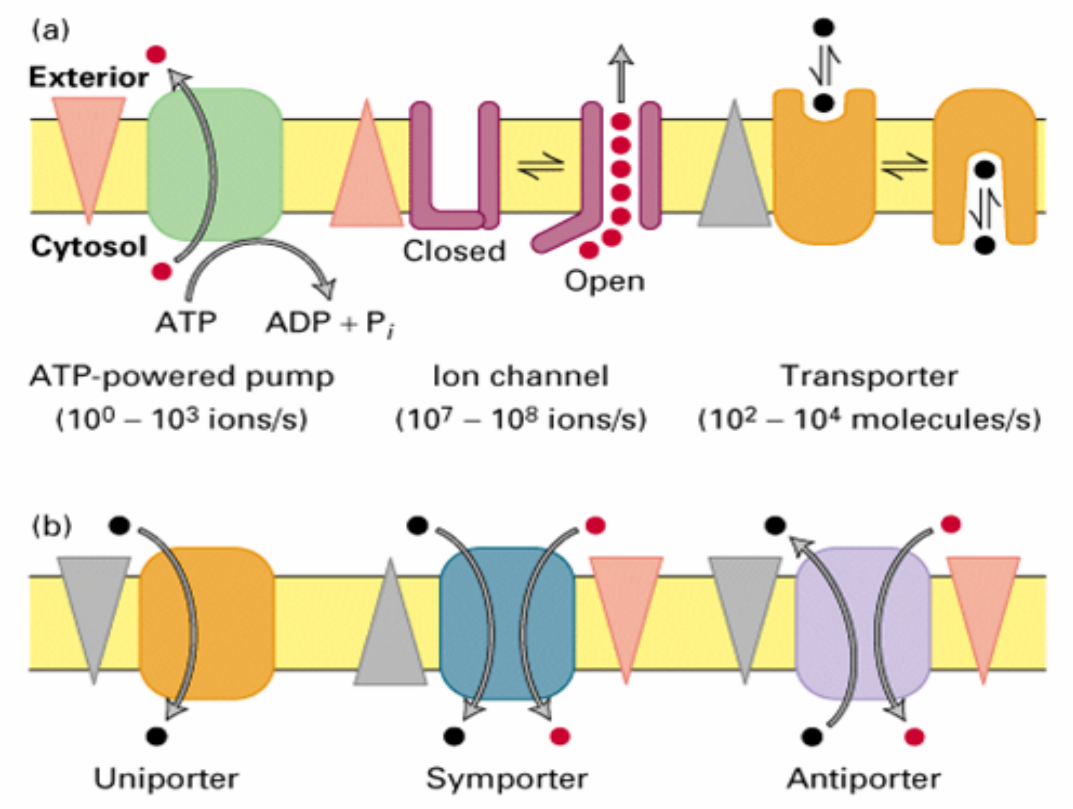


图 5-12 几类转运蛋白的比较

第三节 膜泡运输的基本概念

真核细胞通过内吞作用（endocytosis）和外排作用（exocytosis）完成大分子与颗粒性物质的跨膜运输。在转运过程中，质膜内陷，形成包围细胞外物质的囊泡，因此又称膜泡运输。细胞的内吞和外排活动总称为吞排作用（cytosis）。

一、吞噬作用

细胞内吞较大的固体颗粒物质（图 5-13），如细菌、细胞碎片等，称为吞噬作用（phagocytosis）。吞噬现象是原生动物获取营养物质的主要方式，在后生动物中亦存在吞噬现象。如：在哺乳动物中，中性颗粒白细胞和巨噬细胞具有极强的吞噬能力，以保护机体免受异物侵害。

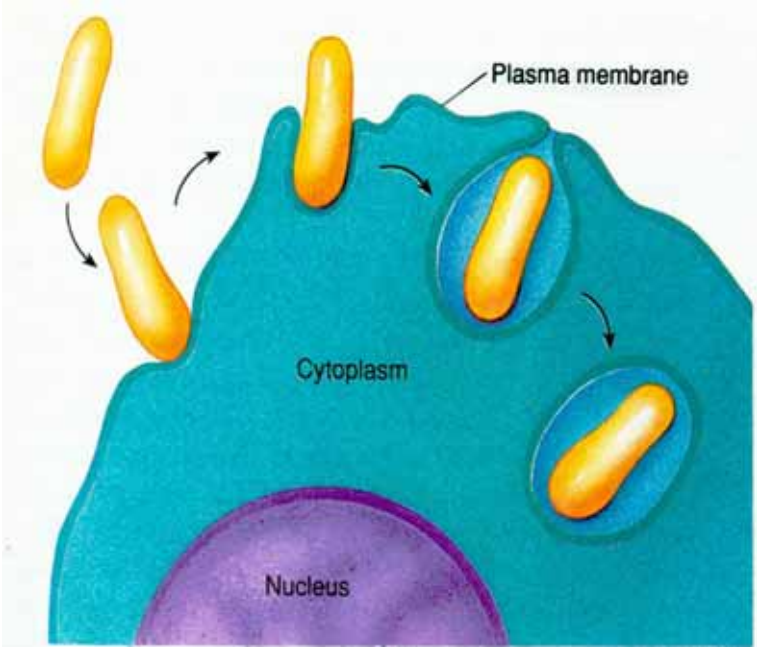


图 5-13 吞噬作用

二、胞饮作用

细胞吞入的物质为液体或极小的颗粒物质（图 5-14），这种内吞作用称为胞饮作用（pinocytosis）。胞饮作用存在于白细胞、肾细胞、小肠上皮细胞、肝巨噬细胞和植物细胞。

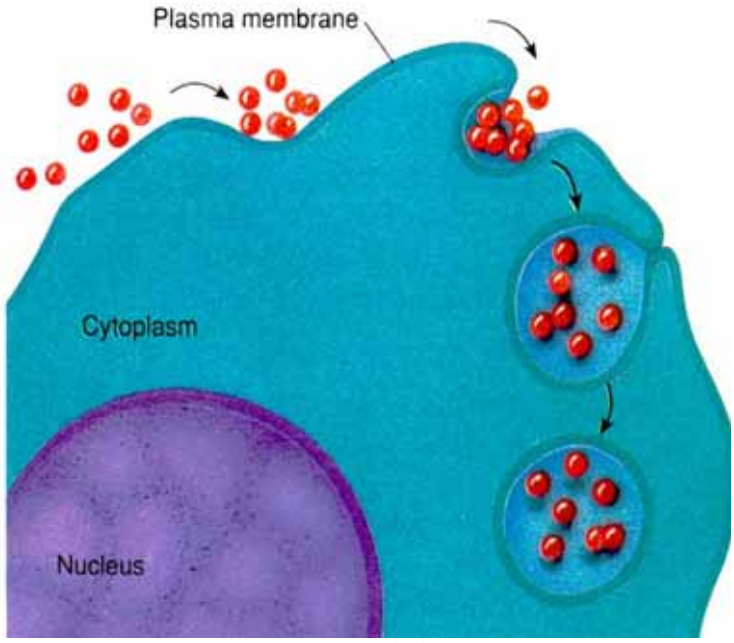


图 5-14 胞饮作用

三、外排作用

与内吞作用的顺序相反，某些大分子物质通过形成小囊泡从细胞内部移至细胞表面，小囊泡的膜与质膜融合，将物质排出细胞之外，这个过程称为外排作用（exocytosis），细胞内不能消化的物质和合成的分泌蛋白都是通过这种途径排出的（图 5-15）。

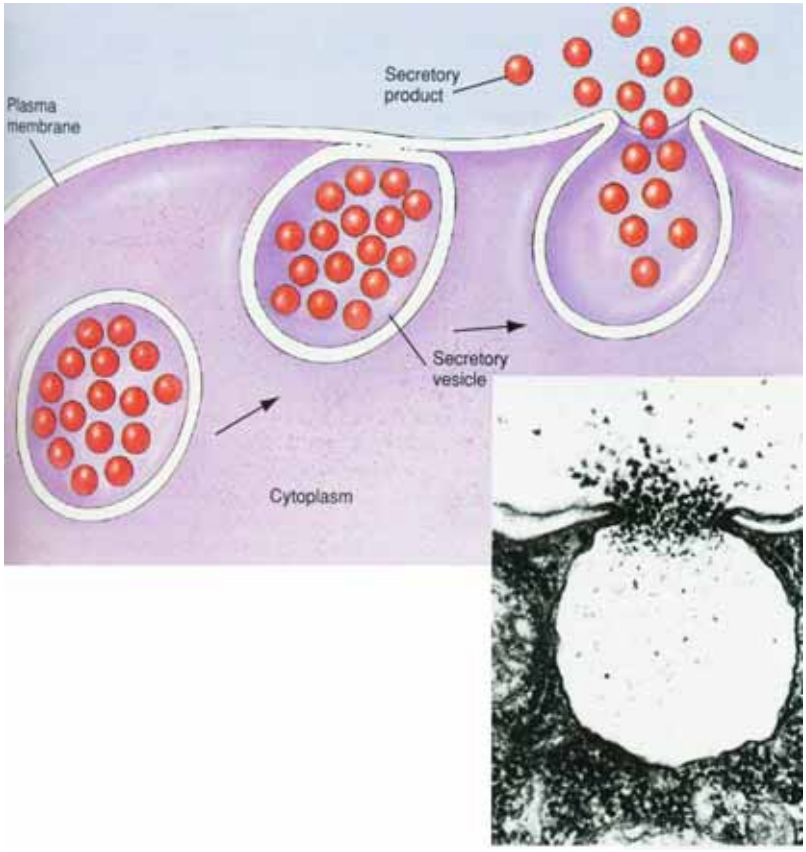


图 5-15 外排作用

四、穿胞运输

在动物组织中，有的细胞通过内吞和外排相偶联，在细胞的一侧形成胞饮小泡穿越细胞质，另一侧使小泡中的物质释放出去。如：肝细胞从血窦中吸收免疫球蛋白 A（IgA），通过穿胞运输输送到胆微管；大鼠中，母鼠血液中抗体经穿胞运输进入乳汁。

五、胞内膜泡运输

细胞内部内膜系统各个部分之间的物质传递也通过膜泡运输方式进行。如从内质网到高尔基体；高尔基体到溶酶体；细胞分泌物的外排，都要通过过渡性小泡进行转运。胞内膜泡运输沿微管运行，动力来自马达蛋白（motor proteins）。目前已发现的马达蛋白有两种：一种是动力蛋白（dynein），可沿微管向负端移动；另一种为驱动蛋白（kinesin），可牵引物质向微管的正端移动。通过这两种蛋白的作用，可使膜泡被运抵一定区域。关于胞内膜跑运输我们将在专门的章节进行较为详细的讲解。

第六章 细胞内功能区隔与蛋白质分选

与原核细胞物不同的是真核细胞具有复杂的由内膜构成的功能区隔。细胞内膜系统指在结构，功能或发生上相关的细胞内膜形成的细胞结构，包括核被膜、内质网、高尔基体及其形成的溶酶体和分泌泡等，以及其它细胞器如线粒体，质体和过氧化物酶体等膜包围的细胞器（膜性细胞器）。

内膜系统形成了一种胞内网络结构，其功能主要在于两个方面：其一是扩大膜的总面积，为酶提供附着的支架，如脂肪代谢、氧化磷酸化相关的酶都结合在细胞膜上。其二是将细胞内部区分为不同的功能区域，保证各种生化反应所需的独特的环境。

本章主要介绍内质网、高尔基体、溶酶体、过氧化物酶体的功能和蛋白质分选，关于线粒体、叶绿体和细胞核的功能与蛋白质分选将分别在第七章（线粒体与叶绿体）和第十二章（细胞核与染色体）中讲解。

第一节 蛋白质分选的基本原理

从系统发生来看内膜系统起源于质膜的内陷和内共生（线粒体、叶绿体），从个体发生来看新细胞的内膜系统来源于原有内膜系统的分裂。当细胞进行分裂时，不仅要进行染色体和细胞核的复制，同时各种细胞器通过吸收新合成的成分长大，然后随着细胞的分裂分配到子细胞中去。细胞不能从无到有产生所有膜性细胞器，新的膜性细胞器来源于已存在细胞器的分裂。如果彻底移除细胞内所有的过氧化物酶体，细胞根本不能重建新的过氧化物酶体，因为过氧化物酶体中具有选择性地接受细胞质内合成的蛋白质的转位因子（translocator）。细胞内合成的蛋白质、脂类等物质之所以能够定向的转运到特定的细胞器取决于两个方面：其一是蛋白质中包含特殊的信号序列（signal sequence or targeting sequence ），其二是细胞器上具特定的信号识别装置（分选受体，sorting receptor），因此内膜系统的发生具有核外遗传的特性。

一、蛋白质分选信号

细胞类至少存在两类蛋白质分选的信号（图 6-1）：

①信号序列（signal sequence）：存在于蛋白质一级结构上的线性序列，通常 15-60 个氨基酸残基，有些信号序列在完成蛋白质的定向转移后被信号肽酶（signal peptidase）切除.

②信号斑（signal patch）：存在于完成折叠的蛋白质中，构成信号斑的信号序列之间可以不相邻，折叠在一起构成蛋白质分选的信号。

蛋白质分选信号的作用是引导蛋白质从胞质溶胶进入内质网、线粒体、叶绿体和过氧化物酶体，也可以引导蛋白质从细胞核进入细胞质或从 Golgi 体进入内质网。这种分选信号的氨基酸残基有时呈线性排列，有时折叠成信号斑，如引导蛋白质定向运输到溶酶体的信号斑，是溶酶体酸性水解酶被高尔基体选择性加工的标识。

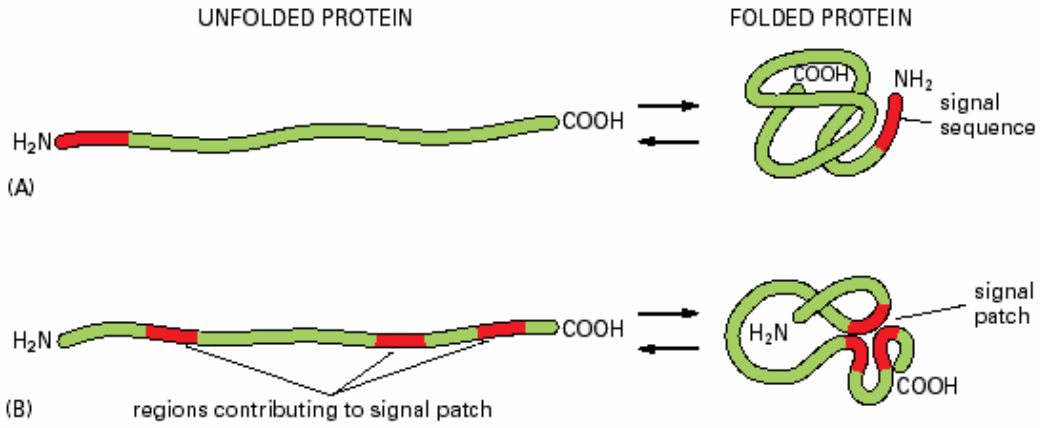


图 6-1 两类分选信号 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

表 1 一些典型的分选信号

功能	信号序列
输入细胞核	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
输出细胞核	-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile-
输入线粒体	$^{+}H_3N$-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
输入质体	$^{+}H_3N$-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala-Ser-Leu-Gln-Ser-Ser-Met-Ser-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Ser-Asn-Ser-Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu-Ser-Pro-Ile-Thr-Leu-Ser-Pro-Phe-Leu- Gln-Gly-
输入过氧化物酶体	-Ser-Lys-Leu-COO^{-}
输入内质网	$^{+}H_3N$-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys- Glu-Val-Phe-Gln-
返回内质网	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO^{-}（KDEL）
由质膜到内体	Tyr-X-X-Φ

每一种信号序列决定特殊的蛋白质转运方向，如输入内质网的蛋白质通常 N 端具有一段信号序列，含有 6-15 个带正电荷的非极性氨基酸。由高尔基体返回内质

网的蛋白质，其 C 端的四个氨基序列，一些已知的分选信号见表 1。目前对于信号斑了解较少，主要是因为它存在于复杂的三维结构中，很难将其分离出来研究。

二、蛋白质分选运输的途径

蛋白质的分选运输途径主要有三类：

1、门控运输（gated transport）：如核孔可以选择性的主动运输大分子物质和 RNP 复合体，并且允许小分子物质自由进出细胞核。

2、跨膜运输（transmembrane transport）：蛋白质通过跨膜通道进入目的地。如细胞质中合成的蛋白质在信号序列的引导下，通过线粒体上的转位因子，以解折叠的线性分子进入线粒体。

3、膜泡运输（vesicular transport）：蛋白质被选择性地包装成运输小泡，定向转运到靶细胞器。如内质网向高尔基体的物质运输、高尔基体分泌形成溶酶体、细胞摄入某些营养物质或激素，都属于这种运输方式。

这几种运输机制都涉及信号序列的引导和靶细胞器上受体蛋白的识别。

第二节 膜泡运输

细胞内部内膜系统各个部分之间的物质传递常常通过膜泡运输方式进行。如从内质网到高尔基体；高尔基体到溶酶体；细胞分泌物的外排，都要通过过渡性小泡进行转运。膜泡运输是一种高度有组织的定向运输，各类运输泡之所能够被准确地运到靶细胞器，主要是因为细胞器的胞质面具有特殊的膜标志蛋白。许多膜标志蛋白存在于不止一种细胞器，可见不同的膜标志蛋白组合，决定膜的表面识别特征。

大多数运输小泡是在膜的特定区域以出芽的方式产生的。其表面具有一个笼子状的由蛋白质构成的衣被（coat）。这种衣被在运输小泡与靶细胞器的膜融合之前解体。衣被具有两个主要作用：①选择性的将特定蛋白聚集在一起，形成运输小泡；②如同模具一样决定运输小泡的外部特征，相同性质的运输小泡之所以具有相同的形状和体积，与衣被蛋白的组成有关。

胞内膜泡运输沿微管或微丝运行，动力来自马达蛋白（motor proteins）。与膜泡运输有关的马达蛋白有 3 类：一类是动力蛋白（dynein），可向微管负端移动；另一类为驱动蛋白（kinesin），可牵引物质向微管的正端移动；第三类是肌球蛋白（myosin）,可向微丝的正极运动。在马达蛋白的作用下，可将膜泡转运到特定的区域，

一、衣被类型

已知三类具有代表性的衣被蛋白，即：笼形蛋白（clathrin）、COPI 和 COPII，个介导不同的运输途径（表 2）。

表 2 衣被小泡的类型与功能

衣被类型	GTP 酶	组成与衔接蛋白	运输方向
clathrin	Arf	Clathrin 重链与轻链，AP2	质膜→内体
		Clathrin 重链与轻链，AP1	高尔基体→内体
		Clathrin 重链与轻链，AP3	高尔基体→溶酶体
			高尔基体→植物液泡
COP I	Arf	COPαββ'γδεζ	高尔基体→内质网
COP II	Sar 1	Sec23/Sec24 复合体，Sec 13/31 复合体，Sec 16，Sec 12	内质网→高尔基体

（一）笼形蛋白衣被小泡

笼形蛋白衣被小泡是最早发现的衣被小泡，介导高尔基体到内体、溶酶体、植物液泡的运输，以及质膜到内膜区隔的膜泡运输。

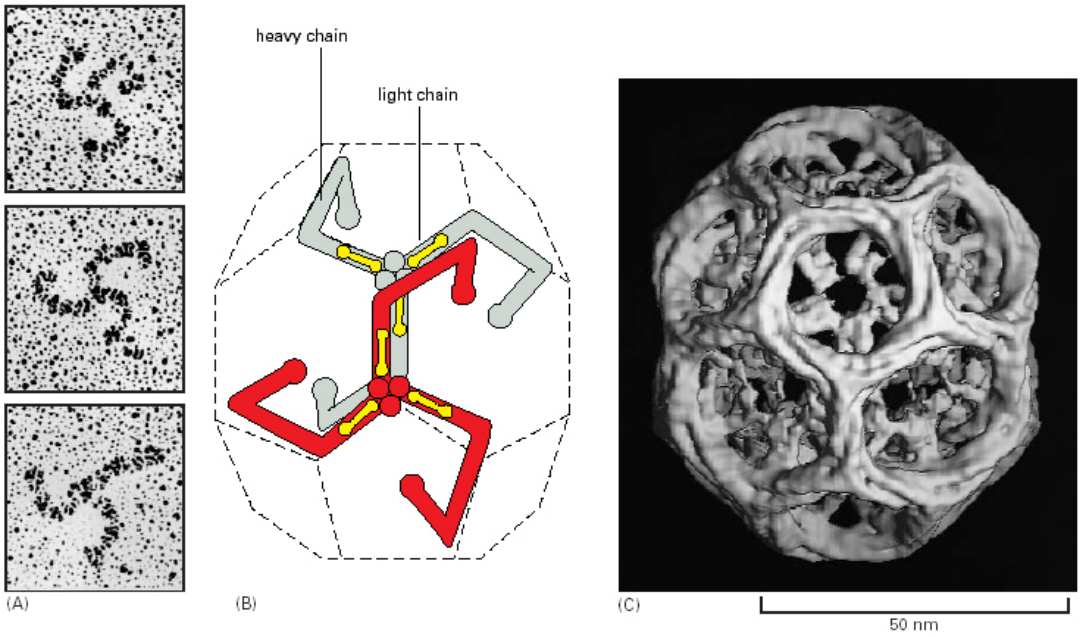


图 6-2 笼形蛋白的结构，A 电镜照片，B 分子模型，C 衣被模型 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

笼形蛋白分子由 3 个重链和 3 个轻链组成（图 6-2），形成一个具有 3 个曲臂的形状（triskelion）。许多笼形蛋白的曲臂部分交织在一起，形成一个具有 5 边形网孔的笼子（图 6-3）。

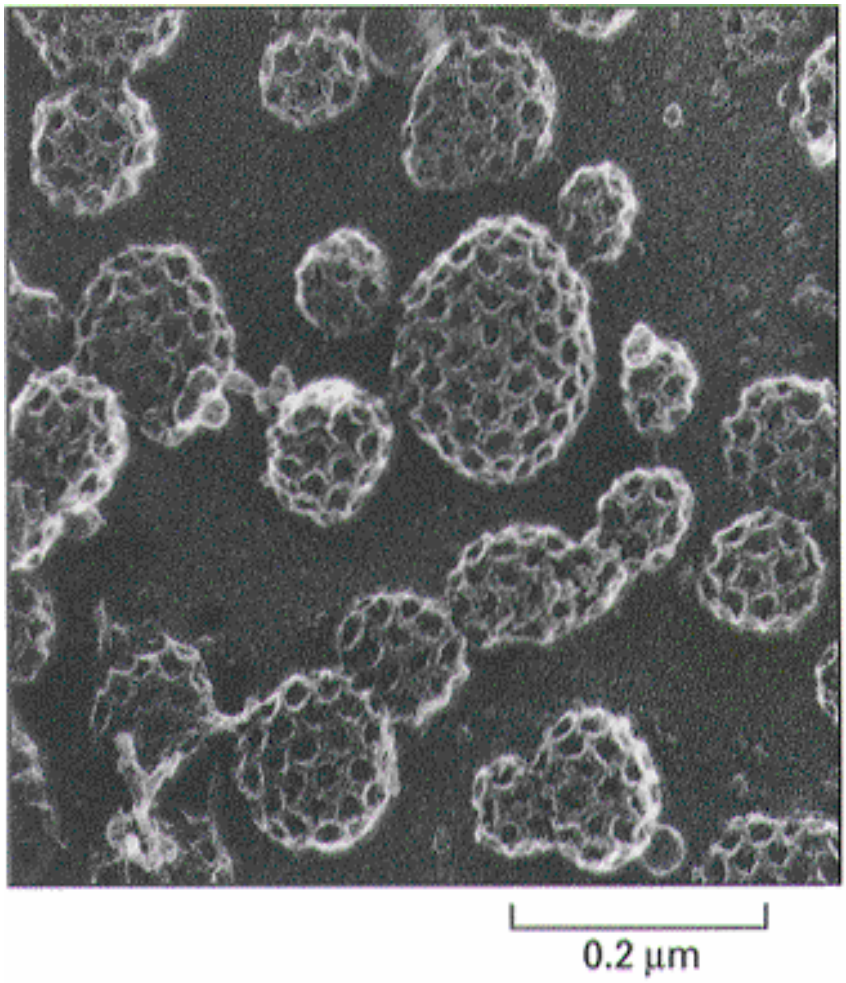


图 6-3 笼形蛋白衣被小泡的形态

笼形蛋白形成的衣被中还有衔接蛋白（adaptin）。它介于笼形蛋白与配体受体复合物之间，起连接作用（图 6-4）。目前至少发现 4 种不同类型的衔接蛋白，可分别结合不同类型的受体，形成不同性质的转运小泡，如 AP1 参与高尔基体→内体的运输、AP2 参与质膜→内体的运输、AP3 参与高尔基体→溶酶体的运输。

当笼形蛋白衣被小泡形成时，可溶性蛋白动力素（dynamin）聚集成一圈围绕在芽的颈部（图 6-5），将小泡柄部的膜尽可能地拉近（小于 1.5nm），从而导致膜融合，掐断（pinch off）衣被小泡。动力素是一种 GTP 酶，调节小泡以出芽形式脱离膜的速率。动力素可以召集其它可溶性蛋白在小泡的颈部聚集，通过改变膜的形状和膜脂的组成，促使小跑颈部的膜融合，形成衣被小泡。

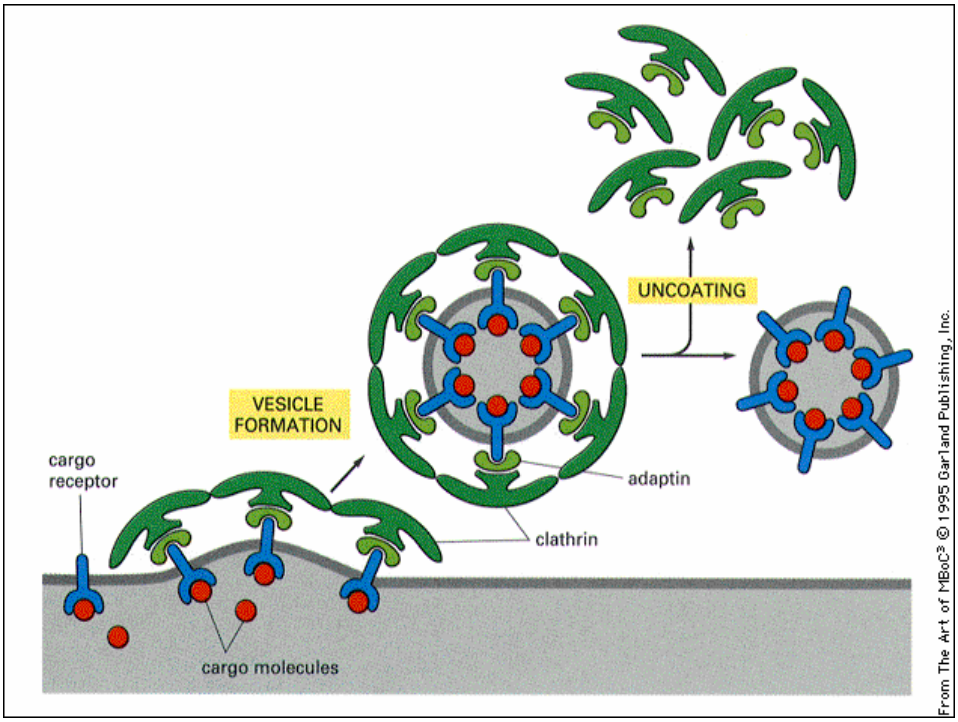


图 6-4 笼形衣被小泡的组成

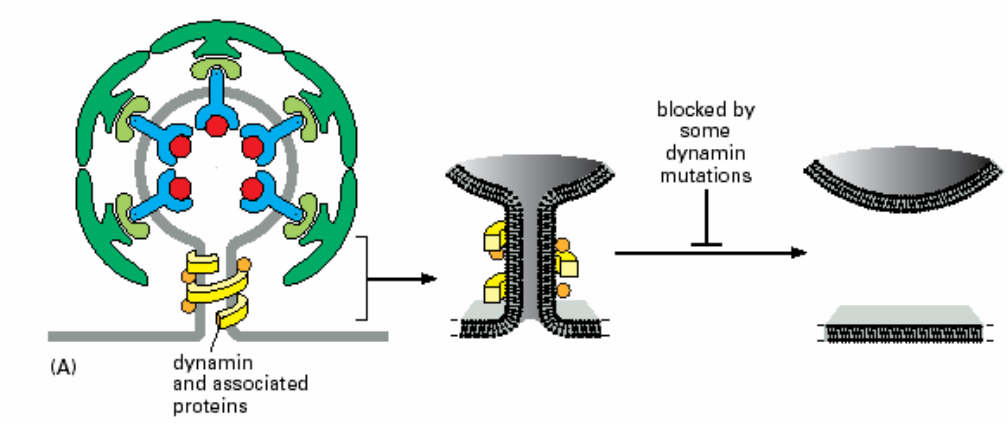


图 6-5 Clathrin 衣被小泡的掐断过程 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

当衣被小泡从膜上释放后，衣被很快就解体，属于 hsp70 家族的一种分子伴侣（molecular chaperone）充当衣被解体的 ATP 酶，一种辅蛋白（auxillin）可以激活这种 ATP 酶。

（二）COP I 衣被小泡

负责回收、转运内质网逃逸蛋白（escaped proteins）返回内质网（图 6-6、7）。起初发现于高尔基体碎片，在含有 ATP 的溶液中温育时，能形成非笼形蛋白包被的小泡。进一步的研究发现这种衣被蛋白复合体包含多达 7 种肽链。

内质网向高尔基体输送运输小泡时，一部分自身的蛋白质也不可避免的被运送到了高尔基体，如不进行回收则内质网因为磷脂和某些蛋白质的匮乏而停止工作。内质网通过两种机制维持蛋白质的平衡 ：一是转运泡将应被保留的驻留蛋白排斥在外，例如有些驻留蛋白参与形成大的复合物，因而不能被包装在出芽形成的转运泡中，结果被保留下来；二是通过对逃逸蛋白的回收机制，使之返回它们正常驻留的部位。

内质网的正常驻留蛋白，不管在腔中还是在膜上，它们在 C 端含有一段回收信号序列（retrieval signals），如果它们被意外地逃逸进入转运泡从内质网运至高尔基体 cis 面，则 cis 面的膜结合受体蛋白将识别并结合逃逸蛋白的回收信号，形成 COPI 衣被小泡将它们返回内质网。内质网腔中的蛋白，如蛋白二硫键异构酶和协助折叠的分子伴侣，均具有典型的回收信号 Lys-Asp-Glu-Leu（KDEL，图 6-8）。内质网的膜蛋白（如 SRP 受体）在 C 端有一个不同的回收信号，通常是 Lys-Lys-X-X（KKXX，X：任意氨基酸），同样可保证它们的回收。

COP I 衣被小泡还可以介导高尔基体不同区域间的蛋白质运输。

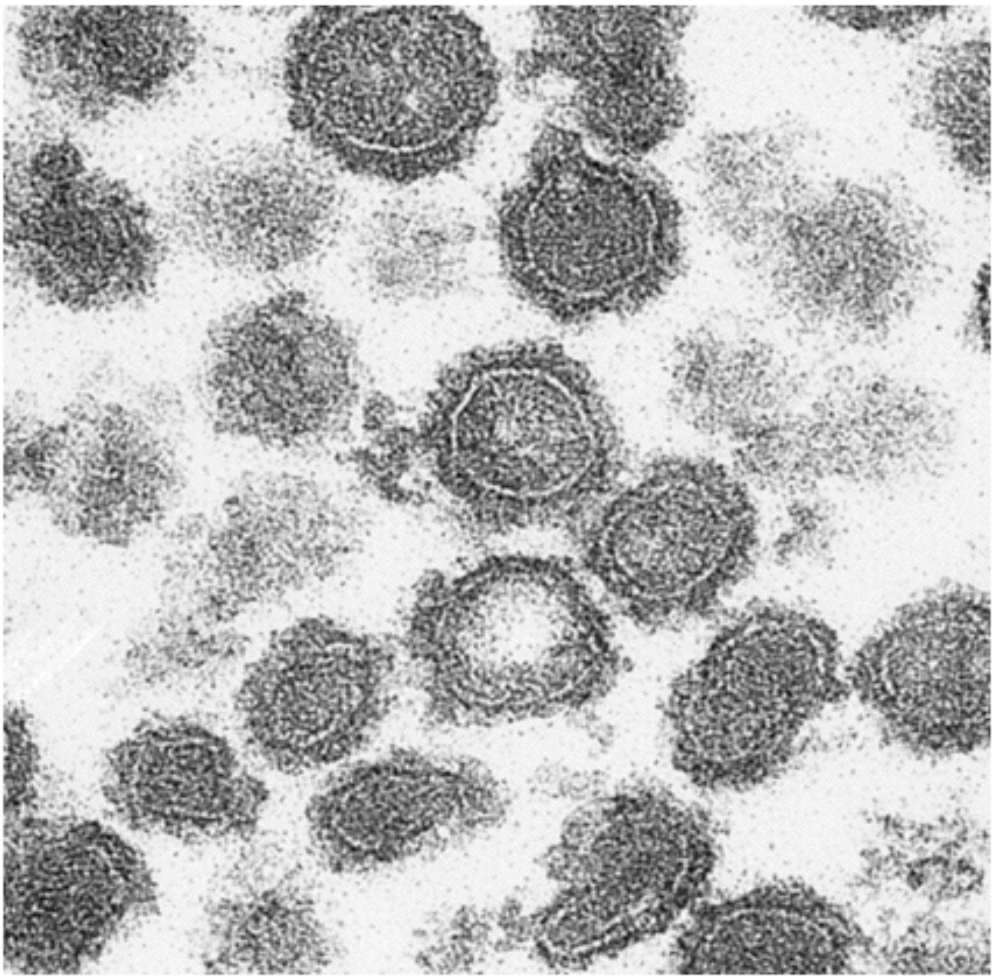


图 6-6 COP I 衣被小泡的形态

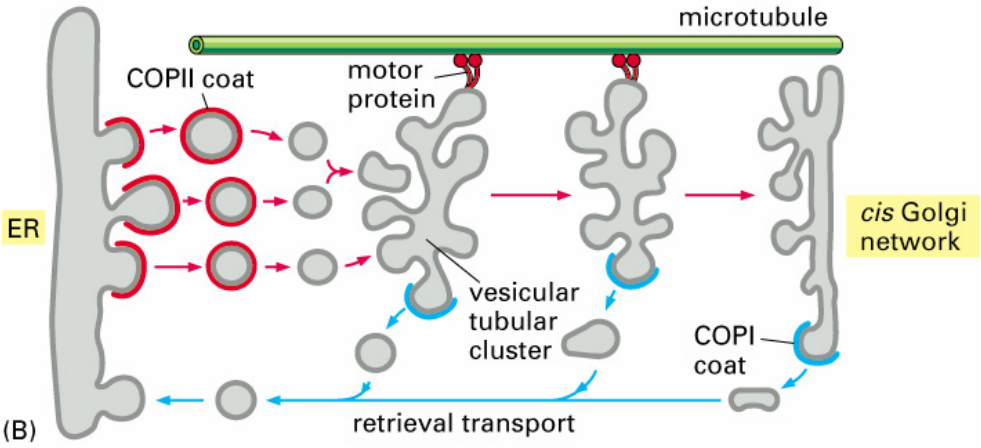


图 6-7 COPI 和 COPII 衣被小泡 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

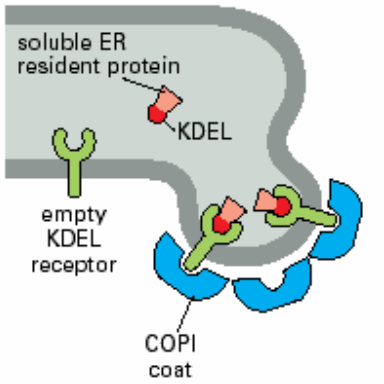


图 6-8 KDEL 序列 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

（三）COP II 衣被小泡

介导从内质网到高尔基体的物质运输。最早发现于酵母 ER 在 ATP 存在的细胞质液中温育时，ER 膜上能形成类似于 COP I 的衣被小泡，某些温度敏感型的酵母，由于 COP II 衣被蛋白发生变异，在特定温度下会在内质网中积累蛋白质。

COP II 衣被由多种蛋白质构成（参见表 2），其中 Sar1GTP 酶与 Sec23/Sec24 复合体结合在一起，形成紧紧包围着膜的一层衣被，Sec13/Sec31 复合体形成覆盖在外围的一层衣被，Sec16 推测可能是一种骨架蛋白，Sec12 是 Sar1 的鸟苷酸交换因子。真核生物的 COP II 衣被蛋白亚单位具有一些横向同源物（Paralog）[11]，这些同源物可能介导不同的蛋白质转运，具有不同的调节机制。在实验条件下，纯化的 Sar1、Sec23/Sec24、Sec13/Sec31 等 5 种成分足以在人工脂质体上形成小泡，说明这些成分具有改变膜的形状和掐断运输小泡的功能。

COP II 衣被小泡形成与内质网的特殊部位，称为内质网出口（exit sites），这些部位没有核糖体，由交织在一起的管道和囊泡组成网络结构。

[11]起源于同一祖先，在不同生物体中行使同一功能的基因，称为“直向同源物（Ortholog），同一生物体中同一基因复制而产生的多个蛋白质称为旁系同源物或横向同源物（Paralog）。

由内质网到高尔基体的蛋白转运中，大多数跨膜蛋白是直接结合在 COP II 衣被上，但是少数跨膜蛋白和多数可溶性蛋白通过受体与 COP II 衣被结合，这些受体在完成转运后，通过 COP I 衣被小泡返回内质网。

COP II 衣被所识别的分选信号位于跨膜蛋白胞质面的结构域，形式多样，有些包含双酸性基序[DE]X[DE]（D 为 Asp，E 为 Glu，X 为任何一种氨基酸），如 Asp-X-Glu 序列，其他一些具有短的疏水基序，如 FF，YYM，FY，LL，IL 等等（其中 F 为 Phe，Y 为 Tyr，M 为 Met，L 为 Leu，I 为 Ile）。

二、衣被的形成

衣被是在一类叫作衣被召集 GTP 酶（coat-recruitment GTPase）作用下形成的。衣被召集 GTP 酶通常为单体 GTP 酶（monomeric GTPase），也叫 G 蛋白，起分子开关的作用，结合 GDP 的形式没有活性，位于细胞质中，结合 GTP 而活化，转位至膜上，能与衣被蛋白结合，促进核化和组装。

G 蛋白具有两类重要的调节蛋白，即：鸟苷酸交换因子（guanine-nucleotide exchange factor, GEF）和 GTP 酶激活蛋白（GTPase activating protein, GAP）。GEF 的作用是使 G 蛋白释放 GDP，结合 GTP 而激活。GAP 的作用是激活 G 蛋白的酶活性，使 GTP 水解，G 蛋白失活，G 蛋白本身的 GTP 酶活性不高。除单体 G 蛋白以外，三聚体 G 蛋白也起分子开关的作用，控制衣被小泡的形成。

衣被召集 GTP 酶包括 Arf 蛋白和 Sar 1 蛋白（图 6-9），Arf 参与高尔基体上笼形蛋白衣被与 COP I 衣被的形成，Sar 1 参与内质网上 COP II 衣被的形成，两者的作用方式大体相似。质膜上笼形蛋白衣被的形成也与 GTP 酶有关，但其成分尚不明确。

衣被召集 GTP 酶大量存在于细胞质中，但处于结合 GDP 的失活状态。当内质网上要形成 COPII 衣被小泡时，Sar 1 释放 GDP 结合 GTP 而激活，激活的 Sar 1 暴露出一条脂肪酸的尾巴，插入内质网膜，然后开始召集衣被蛋白，以衣被蛋白为模型形成运输小泡。活化的衣被召集 GTP 酶还可以激活磷脂酶 D（phospholipase D），将一些磷脂水解，使形成衣被的蛋白质牢固地结合在膜上。

衣被召集 GTP 酶对衣被的形成其动态调节作用，当多数衣被召集 GTP 酶处于结合 GTP 的状态时，它催化衣被的形成；反之当多数衣被召集 GTP 酶处于结合 GDP 的状态时，它催化衣被的解体。因此衣被的形成过程是边形成便解体的动态过程，只有在组装速率大于解体速率时，才能形成衣被小泡。

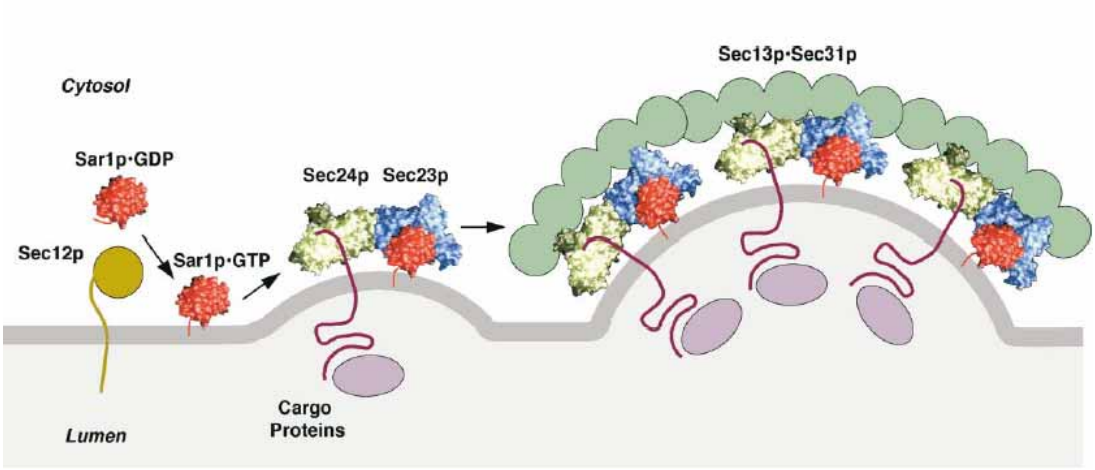


图6-9 COP II衣被小泡的组装 引自Juan S. Bonifacino等 2004

三、膜泡运输的定向机制

衣被小泡沿着细胞内的微管被运输到靶细胞器，马达蛋白水解 ATP 提供运输的动力。各类运输小泡之所以能够被准确地和靶膜融合，是因为运输小泡表面的标志蛋白能被靶膜上的受体识别，其中涉及识别过程的两类关键性的蛋白质是 SNAREs（soluble NSF attachment protein receptor）和 Rabs（targeting GTPase）。其中 SNARE 介导运输小泡特异性停泊和融合，Rab 的作用是使运输小泡靠近靶膜。

（一）SNAREs

SNAREs 的作用是保证识别的特异性和介导运输小泡与目标膜的融合，动物细胞中已发现 20 多种 SNAREs，分别分布于特定的膜上，位于运输小泡上的叫作 v-SNAREs，位于靶膜上的叫作 t-SNAREs（图 6-10）。v-SNAREs 和 t-SNAREs 都具有一个螺旋结构域，能相互缠绕形成跨 SNAREs 复合体（trans-SNAREs complexes，图 6-11），并通过这个结构将运输小泡的膜与靶膜拉在一起，实现运输小泡特异性停泊和融合。实验证明包含了 SNARE 的脂质体和包含匹配 SNARE 的脂质体间可发生融合，尽管速度较慢。这说明除了 SNARE 之外，还有其他的蛋白参与运输泡与目的膜的融合。

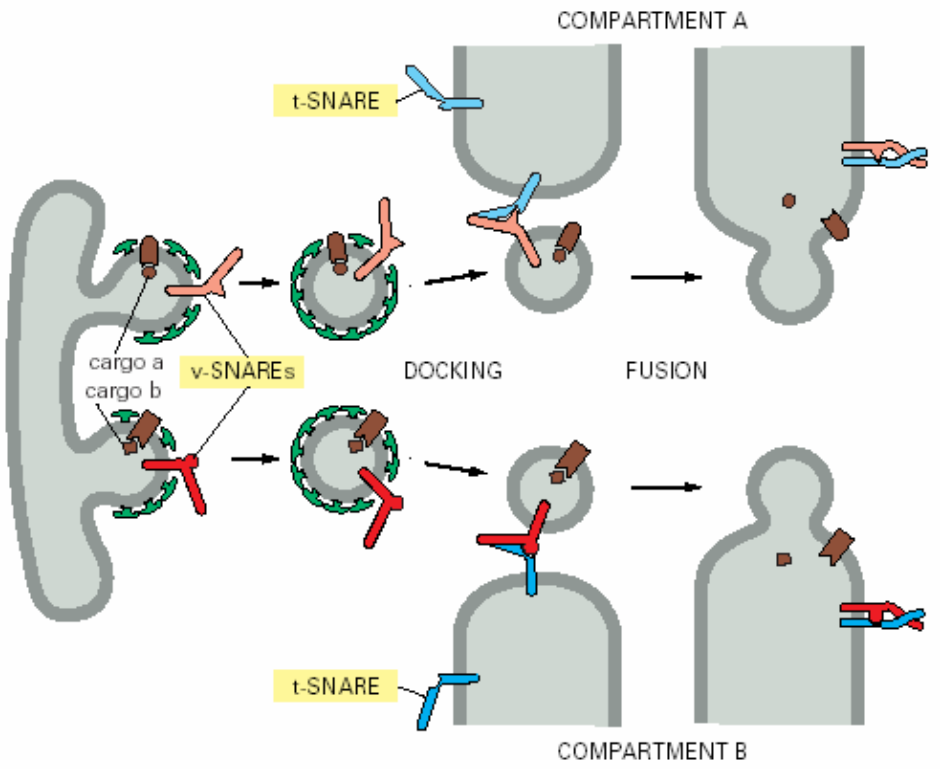


图 6-10 t-和 v-SNARE 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

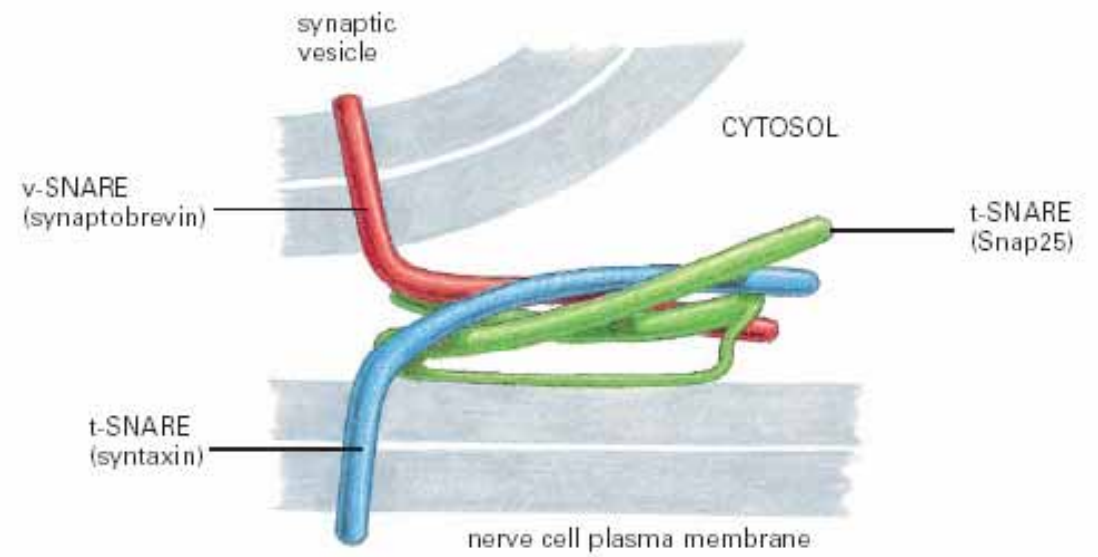


图 6-11 SNARE 复合体 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

在 SNAREs 接到新一轮的运输小泡停泊之前，SNAREs 必须以分离的状态存在，NSF（N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein, NSF）催化 SNAREs 的分离，它是一种类似分子伴娘的 ATP 酶，能够利用 ATP 作为能量通过插入几个适配蛋白（adaptor protein）将 SNAREs 复合体的螺旋缠绕分开（图 6-12）。

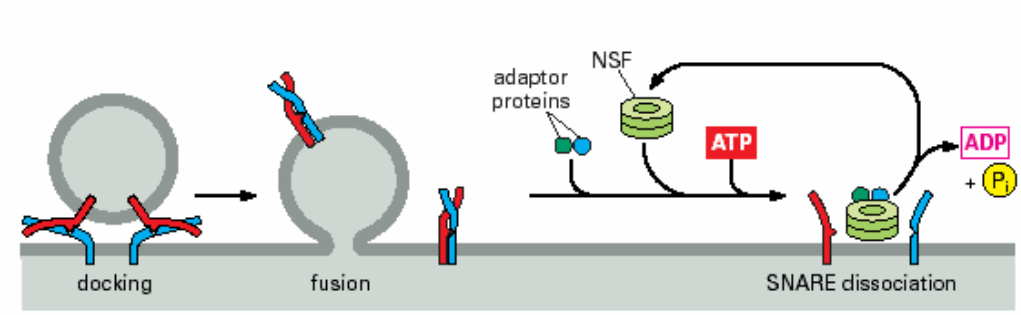


图 6-12 SNARE 复合体的解离 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

在神经细胞中 SNAREs 负责突触小泡的停泊和融合，破伤风毒素和肉毒素等细菌分泌的神经性毒素实际上是一类特殊的蛋白酶，能够选择性地降解 SNAREs，从而阻断神经传导。

精卵的融合、成肌细胞的融合均涉及 SNAREs，另外病毒融合蛋白的工作原理与 SNAREs 相似，介导病毒与宿主质膜的融合（图 6-13）。

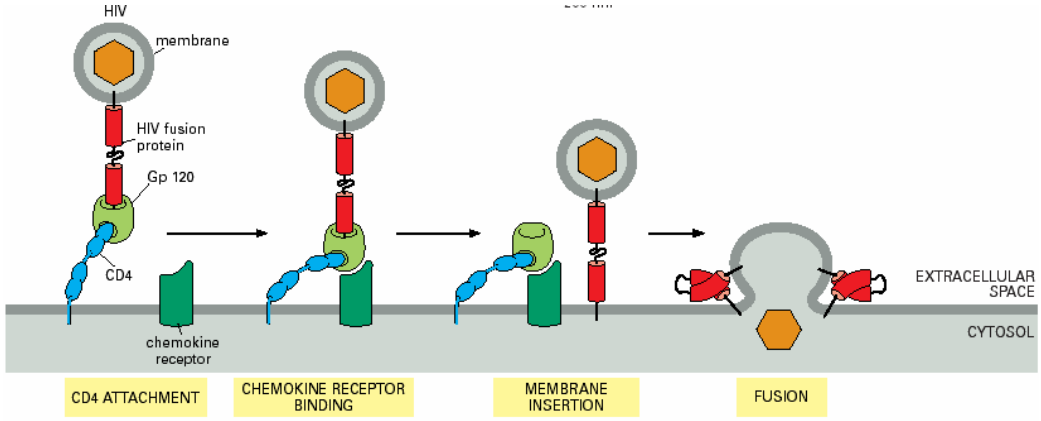


图 6-13 病毒融合蛋白的工作原理 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

（二）Rabs

Rab 也叫 targeting GTPase，属于单体 GTP 酶，结构类似于 Ras，已知 30 余种。不同膜上具有不同的 Rab，每一种细胞器至少含有一种以上的 Rab。Rabs 的作用是促进和调节运输小泡的停泊和融合。与衣被召集 GTP 酶相似的是，起分子开关作用，结合 GDP 失活，位于细胞质中，结合 GTP 激活，位于细胞膜、内膜和运输小泡膜上，调节 SNAREs 复合体的形成。Rabs 的调节蛋白与其它 G 蛋白的相似。Rabs 还有许多效应因子（effector），其作用是帮助运输小泡聚集和靠近靶膜，触发 SNAREs 释放它的抑制因子（图 6-14）。许多运输小泡只有在包含了特定的 Rabs 和 SNAREs 之后才能形成。

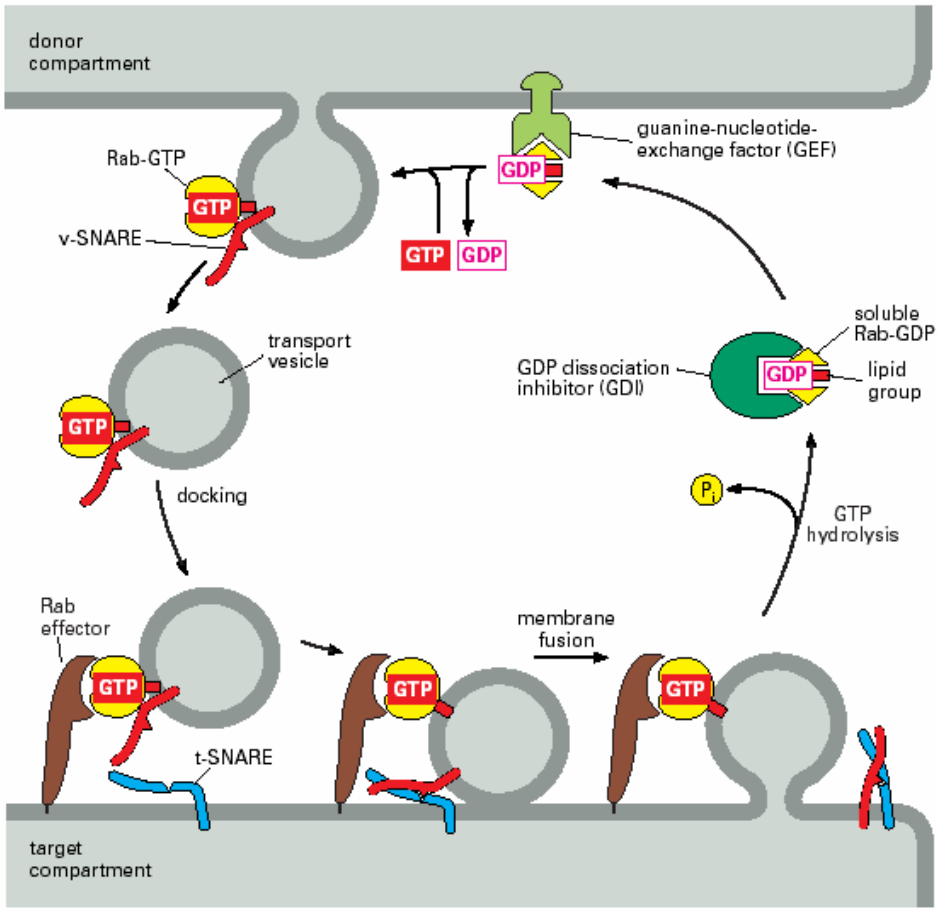


图 6-14 Rab 的作用 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

四、细胞的内吞与外排

（一）受体介导的内吞

细胞的内吞可分为两类，批量内吞（Bulk-phase endocytosis）和受体介导的内吞(Receptor mediated endocytosis, RME)，批量内吞是非特异性的摄入细胞外物质，如培养细胞摄入辣根过氧化物酶。细胞表面的内陷（caveolae）是发生非特异性内吞的部位。

受体介导的内吞作用是一种选择浓缩机制，既可保证细胞大量地摄入特定的大分子，同时又避免了吸入细胞外大量的液体。低密脂蛋白、运铁蛋白、生长因子、胰岛素等蛋白类激素、糖蛋白等，都是通过受体介导的内吞作用进行的。

衣被小窝（coated pits）是质膜向内凹陷的部位，约占肝细胞和成纤维细胞膜表面积的 2%。受体大量集中于此处，凹陷的胞质侧具有大量的笼形蛋白和衔接蛋白，类似的结构也存在于高尔基体的 TGN 区。受体在衣被小窝处的集中与是否结合配体无关。衣被小窝就相当一个分子过滤器（molecular filter），帮助细胞获取所

需要的大分子物质。

运输小泡的衣被中，除笼形蛋白外，还有衔接蛋白（adaptin）。它介于笼形蛋白与配体受体复合物之间，起连接作用。衔接蛋白存在有不同的种类，可分别结合不同类型的受体。

跨膜受体蛋白的胞质端有一个由 4 个氨基酸残基组成的序列（Tyr-X-X-Φ），此序列是发生内吞作用的信号，X 表示任何一种氨基酸，Φ 为分子较大的疏水氨基酸，如 Phe、Leu、Met 等，衔接蛋白对此序列有识别能力。

受体同配体结合后启动内化作用，笼形蛋白开始组装。在 dynamin 的作用下掐断后形成衣被小泡（coated vesicles）。衣被小泡进入胞质后，衣被蛋白随即脱去，分子返回到质膜下方，重又参与形成新的衣被小泡。其过程和高尔基体的 TGN 区形成溶酶体小泡的过程相似。

胆固醇主要在肝细胞中合成，随后与磷脂和蛋白质形成低密脂蛋白（low-density lipoproteins，LDL），释放到血液中。LDL 颗粒的质量为 3X106Da，直径 20~30nm，芯部含有大约 1500 个胆固醇分子，这些胆固醇分子被酯化成长链脂肪酸。芯部周围由一脂单层包围，脂单层包含磷脂分子和未酯化的胆固醇以及一个非常大的单链糖蛋白质 (apolipoprotein B-100)，这个蛋白质分子可以和靶膜上的受体结合（图 6-15）。

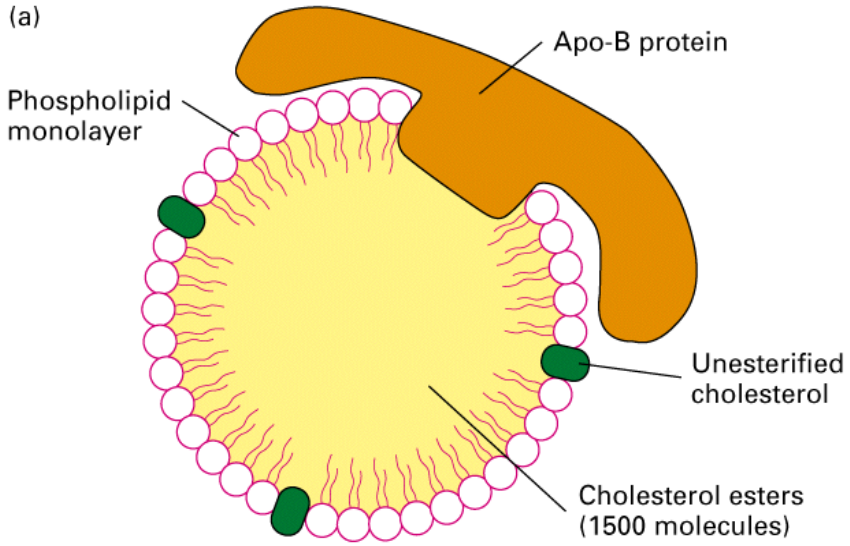


图 6-15 LDL 的结构

当细胞进行膜合成需要胆固醇时，细胞即合成 LDL 跨膜受体蛋白，并将其嵌插到质膜中。受体与 LDL 颗粒结合后，形成衣被小泡；进入细胞质的衣被小泡随即脱掉笼形蛋白衣被，成为平滑小泡，同早期内体融合，内体中 PH 值低，使受体与 LDL 颗粒分离；再经晚期内体将 LDL 送人溶酶体。在溶酶体中，LDL 颗粒中的胆固醇酯被水解成游离的胆固醇而被利用（图 6-16、17A、18）。细胞对胆固醇的利用具有调节能力，当细胞中的胆固醇积累过多时，细胞即停止合成自身的胆固醇，同时也关闭了 LDL 受体蛋白的合成途径，暂停吸收外来的胆固醇。有的人因为 LDL 受体蛋白编码的基因有遗传缺陷，造成血液中胆固醇含量过高（图 6-17B），因而会过早地患动脉粥样硬化症（atherosclerosis），这种人往往因易患冠心病而英年早逝。

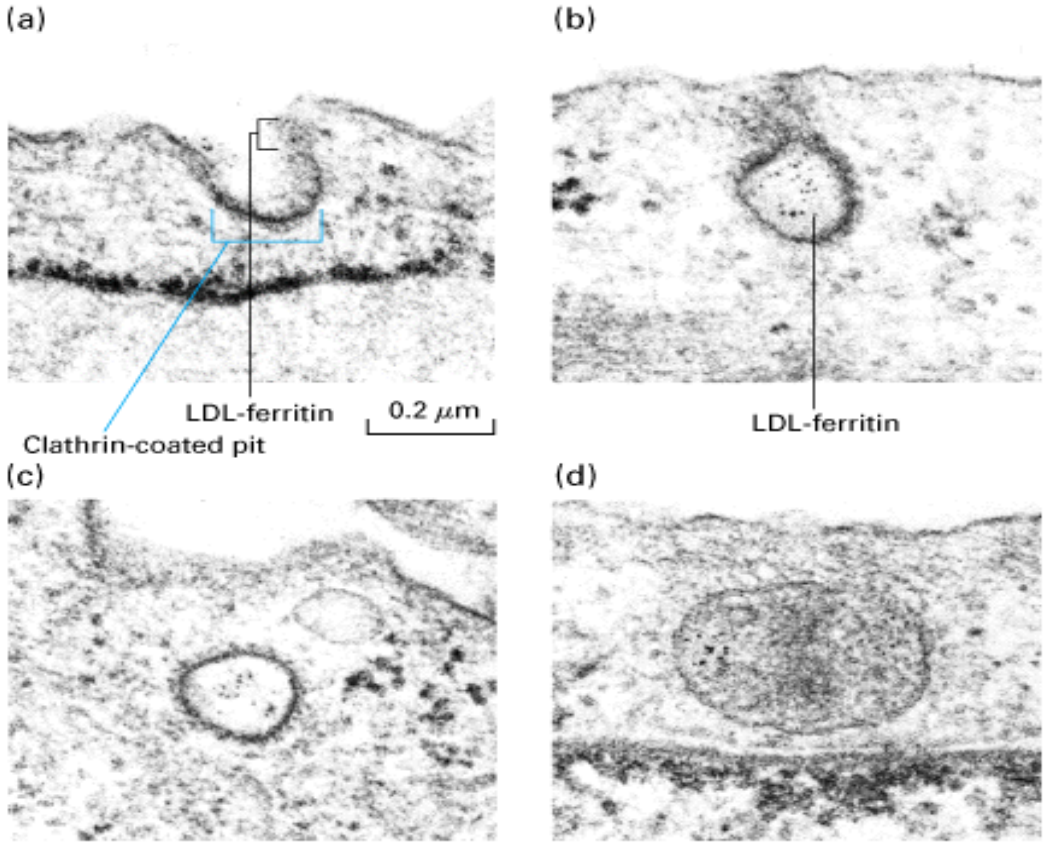


图 6-16 LDL 的内吞

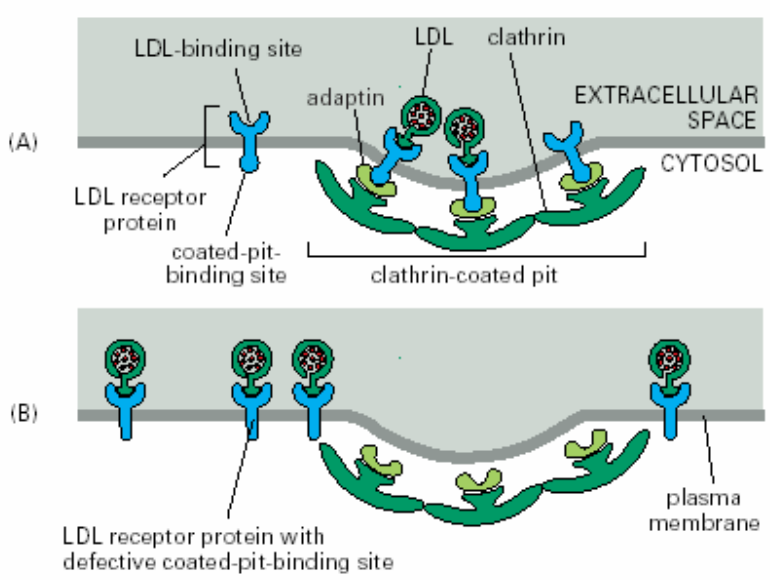


图 6-17 clathrin 衣被的组装，异常的受体不能形成包含货物的运输小泡 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

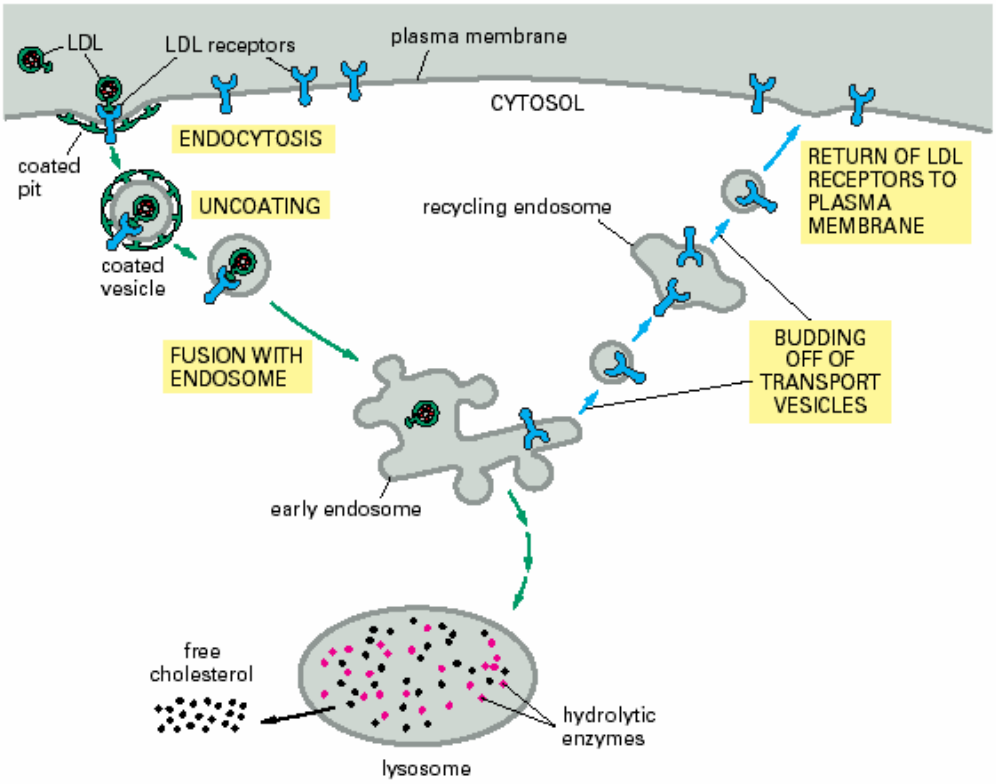


图 6-18 受体介导的内吞 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

在受体介导的内吞作用过程中，不同类型的受体具有不同的胞内体分选途径：①大部分受体返回它们原来的质膜结构域，如 LDL 受体又循环到质膜再利用；②有些受体不能再循环而是最后进入溶酶体，在那里被消化，如与表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）结合的细胞表面受体，大部分在溶酶体被降解，从而导致细胞表面 EGF 受体浓度降低，称为受体下行调节（receptor down-regulation）；③有些受体被运至质膜不同的结构域，该过程称作穿胞运输（transcytosis，图 6-19）。在具有极性的上皮细胞，这是一种将内吞作用与外排作用相结合的物质跨膜转运方式，即转运的物质通过内吞作用从上皮细胞的一侧被摄入细胞，再通过外排作用从细胞的另一侧输出。如母鼠的抗体从血液通过上皮细胞进入母乳中，乳鼠肠上皮细胞将抗体摄入体内，都是通过跨细胞的转运完成的。

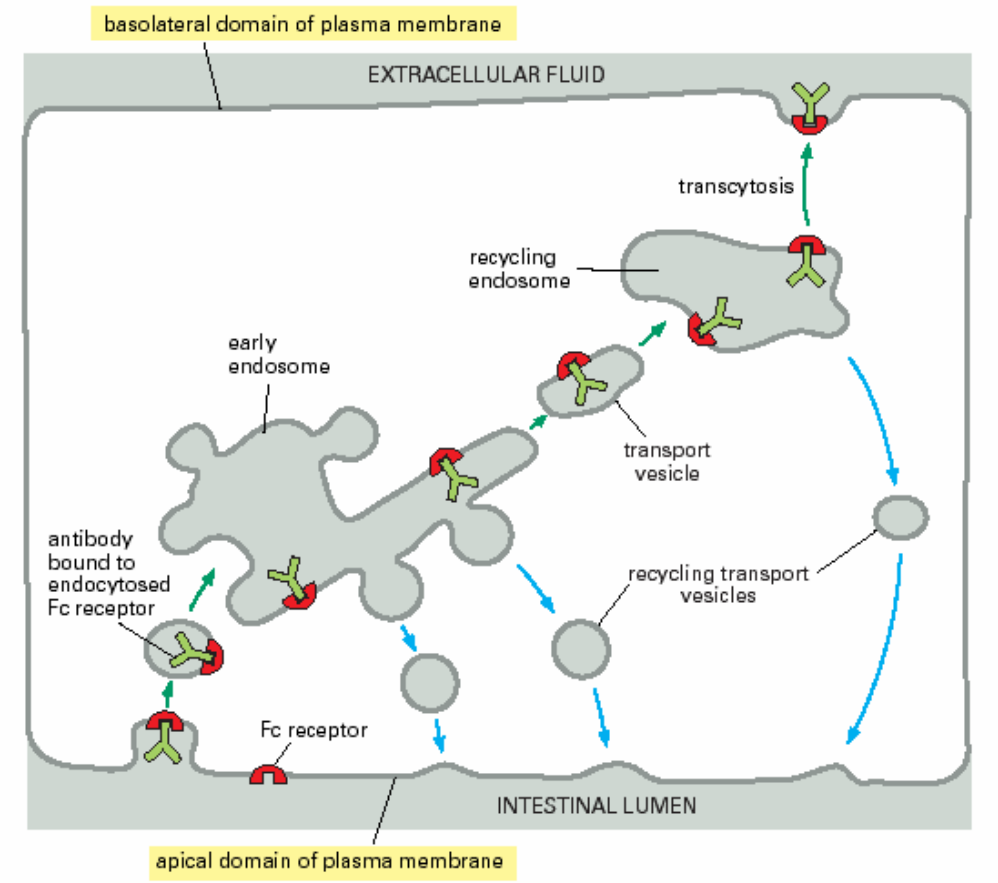


图 6-19 穿胞运输 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

（二）外排作用

与细胞的内吞作用相反，外排作用是将细胞内的分泌泡或其他某些膜泡中的物质通过细胞质膜运出细胞的过程。

组成型的外排途径（constitutive exocytosis pathway）：所有真核细胞都有从高尔基体 TGN 区分泌囊泡向质膜运输的过程，其作用在于更新膜蛋白和膜脂、形成质膜外周蛋白、细胞外基质、或作为营养成分和信号分子。

调节型外排途径（regulated exocytosis pathway）：分泌细胞产生的分泌物（如激素、粘液或消化酶）储存在分泌泡内，当细胞在受到胞外信号刺激时，分泌泡与质膜融合并将内含物释放出去。调节型的外排途径存在于特化的分泌细胞。其蛋白分选信号存在于蛋白本身，由高尔基体 TGN 上特殊的受体选择性地包装为运输小泡。

组成型的外排途径通过 default pathway 完成蛋白质的转运过程。在粗面内质网中合成的蛋白质除了某些有特殊标志的蛋白驻留在 ER 或高尔基体中或选择性地进入溶酶体和调节性分泌泡外，其余的蛋白均沿着粗面内质网→高尔基体→分泌泡→细胞表面这一途径完成其转运过程。

第三节 内质网

由 KR. Porter、A. Claude 和 EF. Fullam 等人于 1945 年发现，他们在观察培养的小鼠成纤维细胞时，发现细胞质内部具有网状结构，建议叫做内质网 endoplasmic reticulum，ER，后来发现内质网不仅仅存在于细胞的“内质”部，通常还有质膜和核膜相连，并且与高尔基体关系密切，并且常伴有许多线粒体。

一、形态与组成

内质网膜约占细胞总膜面积的一半，是真核细胞中最多的膜。内质网是内膜构成的封闭的网状管道系统。具有高度的多型性。可分为粗面型内质网（rough endoplasmic reticulum，RER，图 6-20）和光面型内质网（smooth endoplasmic reticulum，SER，图 6-21）两类。RER 呈扁平囊状，排列整齐，膜围成的空间称为 ER 腔（lumen），膜外有核糖体附着。SER 呈分支管状或小泡状，无核糖体附着。肌肉细胞中的肌质网是一种特化的 SER，称为肌质网，可贮存 Ca^{2+}，引起肌肉收缩。细胞不含纯粹的 RER 或 SER，它们分别是 ER 连续结构的一部分。

ER 主要功能是合成蛋白质和脂类，分泌性蛋白和跨膜蛋白都是在 ER 中合成的。ER 合成的脂类除满足自身需要外，还提供给高尔基体、溶酶体、内体、质膜、线粒体、叶绿体等膜性细胞结构。

ER 膜中含大约 60%的蛋白和 40%的脂类，脂类主要成分为磷脂，磷脂酰胆碱含量较高，鞘磷脂含量较少，没有或很少含胆固醇。ER 约有 30 多种膜结合蛋白，另有 30 多种位于内质网腔，这些蛋白的分布具有异质性，如：葡糖-6-磷酸酶，普遍存在于内质网，被认为是标志酶，核糖体结合糖蛋白（ribophorin）只分布在 RER，P450 酶系只分布在 SER。

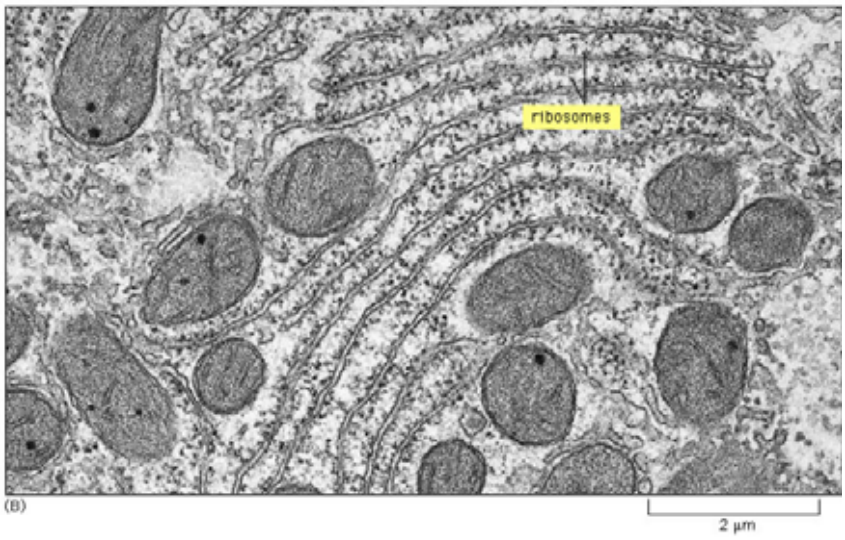


图 6-20 RER 的形态

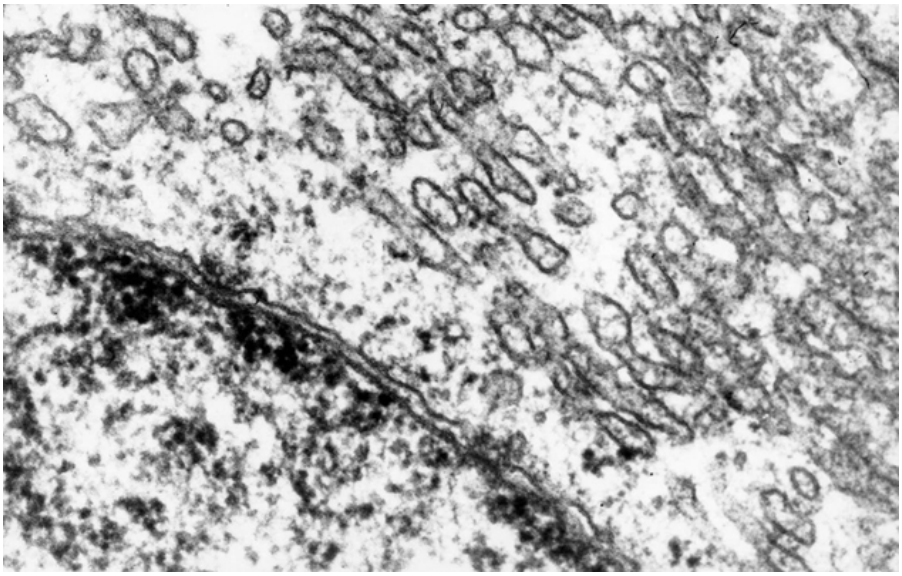


图 6-21 SER 的形态 引自 http://www.uni-mainz.de

二、RER 的功能

（一）蛋白质合成

蛋白质都是在核糖体上合成的，并且起始于细胞质基质，但是有些蛋白质在合成开始不久后便转在内质网上合成，这些蛋白质主要有：①向细胞外分泌的蛋白、如抗体、激素；②跨膜蛋白，并且决定膜蛋白在膜中的排列方式；③需要与其它细胞组合严格分开的酶，如溶酶体的各种水解酶；④需要进行修饰的蛋白，如糖蛋白。

C. Milstein（1972）发现从骨髓瘤细胞提取的免疫球蛋白分子 N 端要比分泌到细胞外的 N 端多出一段。G. Blobel 和 D. Sabatini 等根据进一步的实验，提出了信号假说（Signal hypothesis），认为蛋白质上的信号肽，指导蛋白质转至内质网上合成。Blobel 因此项发现获 1999 年诺贝尔生理医学奖。

蛋白质转入内质网合成至少涉及 5 种成分：

①信号肽（signal peptide），是引导新合成肽链转移到内质网上的一段多肽，位于新合成肽链的 N 端，一般 16~30 个氨基酸残基，含有 6-15 个带正电荷的非极性氨基酸，由于信号肽又是引导肽链进入内质网腔的一段序列，又称开始转移序列（start transfer sequence）。

②信号识别颗粒（signal recognition particle，SRP），由 6 种结构不同的多肽组成，结合一个 7S RNA，分子量 325KD，属于一种核糖核蛋白(ribonucleoprotein)。SRP 与信号序列结合，导致蛋白质合成暂停。

③ SRP 受体（SPR receptor），是膜的整合蛋白，为异二聚体蛋白，存在于内质网上，可与 SRP 特异结合。

④停止转移序列（stop transfer sequence），肽链上的一段特殊序列，与内质

网膜的亲和力很高，能阻止肽链继续进入内质网腔，使其成为跨膜蛋白质。

⑤转位因子（translocator），由 3-4 个 Sec61 蛋白复合体构成的一个类似炸面圈的结构，每个 Sec61 蛋白由三条肽链组成。

蛋白质转入内质网合成的过程：

信号肽与 SRP 结合→肽链延伸终止→SRP 与受体结合→SRP 脱离信号肽→肽链在内质网上继续合成，同时信号肽引导新生肽链进入内质网腔→信号肽切除→肽链延伸至终止→翻译体系解散。这种肽链边合成边向内质网腔转移的方式，称为 co-translation（图 6-22）。

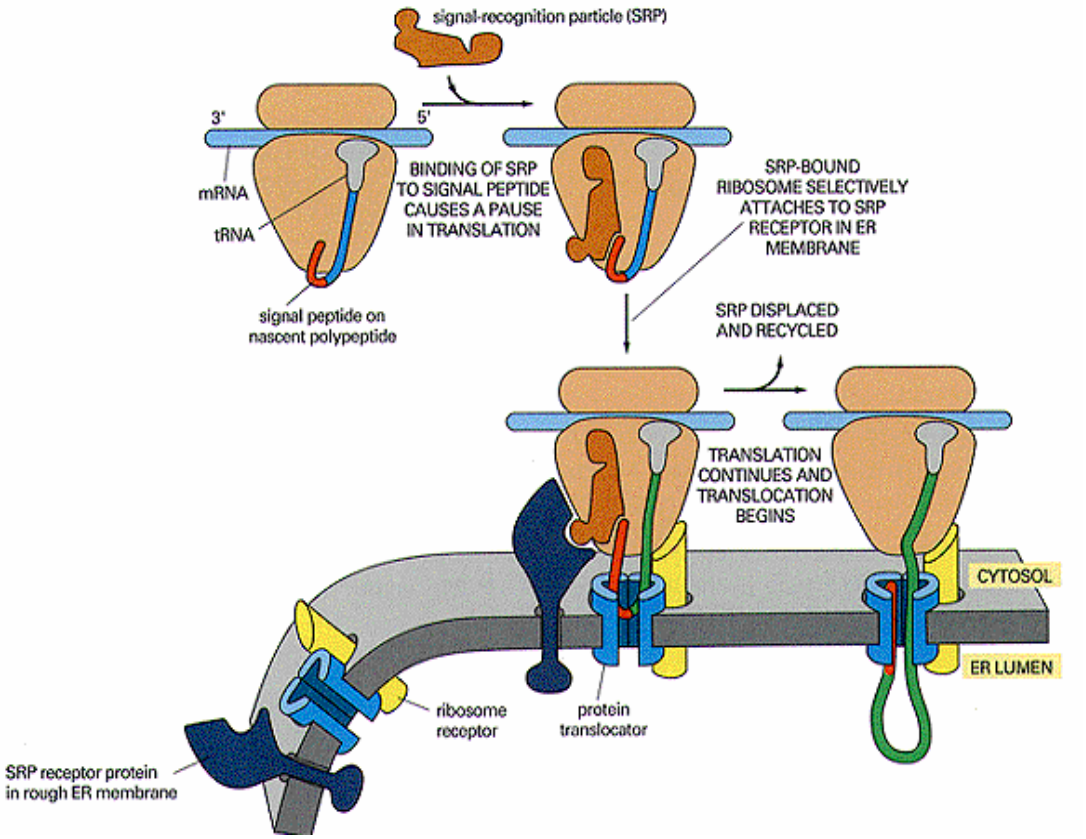


图 6-22 蛋白质转移到内质网上合成的过程

表 3 一些信号肽序列

蛋白质	信号序列
Preproalbumin	Met-Lys-Trp-Val-Thr-**Phe-Leu-Leu-Leu-Leu-Phe-Ile-Ser- Gly-Ser-Ala-Phe-Ser**↓Arg. . .
Pre-IgG light chain	Met-Asp-Met-Arg-Ala-Pro-Ala-Gln-**Ile-Phe-Gly-Phe-Leu- Leu-Leu-Leu-Phe**-Pro-Gly-Thr-Arg-Cys↓Asp. . .
Prelysozyme	Met-Arg-Ser-**Leu-Leu-Ile-Leu-Val-Leu-Cys-Phe-Leu-** Pro-Leu-Ala-Ala-Leu-Gly↓Lys. . .

（二）蛋白质的修饰与加工

包括糖基化、羟基化、酰基化、二硫键形成等，其中最主要的是糖基化，几乎所有内质网上合成的蛋白质最终被糖基化。糖基化的作用是：①使蛋白质能够抵抗消化酶的作用；②赋予蛋白质传导信号的功能；③某些蛋白只有在糖基化之后才能正确折叠。

糖基一般连接在 4 种氨基酸上，分为 2 种：

O-连接的糖基化（O-linked glycosylation）：与 Ser、Thr 和 Hyp 的 OH 连接，连接的糖为半乳糖或 N-乙酰半乳糖胺，在高尔基体上进行 O-连接的糖基化。

N-连接的糖基化（N-linked glycosylation）：与天冬酰胺残基的 NH_2 连接，糖为 N-乙酰葡糖胺（图 6-23）。

内质网上进行的为 N-连接的糖基化。糖的供体为核苷糖(nucleotide sugar)，如 CMP-唾液酸、GDP-甘露糖、UDP-N-乙酰葡糖胺等。糖分子首先被糖基转移酶转移到膜上的磷酸长醇（dolichol phosphate）分子上，装配成寡糖链。再被寡糖转移酶转到新合成肽链特定序列（Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr）的天冬酰胺残基上。

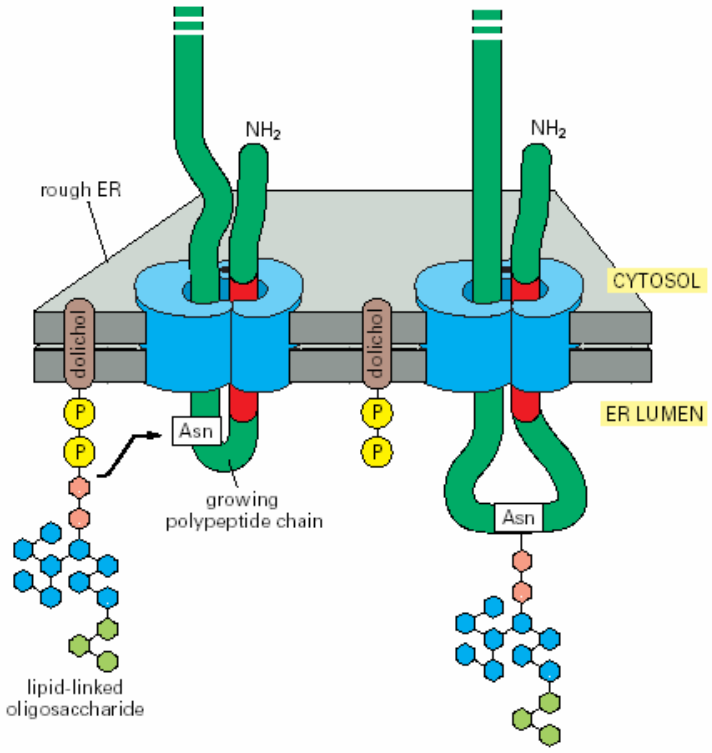


图 6-23 N-连接的糖基化 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

（三）新生肽链的折叠、组装和运输

COP II 介导由内质网输出的膜泡运输，这种膜泡由内质网的排出位点（exit sites）以出芽的方式排出，内质网的排出位点没有结合核糖体，随机分布在内质网

上。不同的蛋白质在内质网腔中停留的时间不同，主要取决于蛋白质完成正确折叠和组装的时间，这一过程是在属于 hsp70 家族的 ATP 酶的作用下完成的，需要消耗能量。有些无法完成正确折叠的蛋白质被输出内质网，转入溶酶体中降解掉，大约 90%的新合成的 T 细胞受体亚单位和乙酰胆碱受体都被降解掉，而从未到达靶细胞膜。

三、ER 的其它功能

合成膜脂：大多数膜只是完全在内质网中合成的，例外的情况包括：①鞘磷脂是在内质网上开始合成的，但完成于高尔基体；②某些线粒体和叶绿体独有的膜脂是驻留在这些细胞器中的酶催化合成的。ER 合成的膜脂以膜跑运输的方式转运至高尔基体，溶酶体和质膜上，或借磷脂转移蛋白（phospholipid transfer protein，PTP）形成水溶性复合物，转至其他膜上。

解毒作用：SER 中的 P450 酶系属于单加氧酶（monooxygenase），又称为多功能氧化酶 (mixed function oxidase)、羟化酶(hydroxylase)，因其还原态的吸收峰在 450nm 处，故名。主要分布在 SER 中，但也存在于质膜、线粒体、高尔基体、过氧化物酶体、核膜等细胞器的膜中，具有解毒作用，通常可将脂溶性有毒物质，代谢为水溶性物质，使有毒物质排出体外。有时也会将致癌物代谢为活性致癌物。P450 种类繁多，但都是与其他辅助成分组成一个呼吸链来实现其功能，呼吸链中的 P450 还原酶实际就是一种黄素蛋白。P450 催化 O2 分子中的一个原子加到底物分子上使之羟化，另一个氧原子被 NADH 或 NADPH 提供的氢还原生成水，在此氧化过程中无高能磷酸化合物生成。

甾体类激素的合成：在生殖腺和肾上腺的内分泌细胞中，SER、线粒体，可能还有高尔基体上的一些酶共同参与甾体类激素的合成。

调节血糖浓度：使葡糖 6-磷酸水解为磷酸和葡萄糖，释放糖至血液中。细胞中的糖元可被酶转化为葡糖 1-磷酸，再转变为葡糖 6-磷酸，但由于膜对磷酸化的糖是高度不通透的，葡糖 6-磷酸只有在去磷酸化以后才能通过质膜，进入血液。

形成一些特殊结构：如肌细胞中的 SER 特化成的肌质网可储存钙离子，作为细胞内信号物质。

支撑作用：内质网是细胞内最丰富的膜，形成了一种网络结构，提供机械支撑作用，并成为细胞质中酶附着的支架。

第四节 高尔基体

最早发现于 1855 年，1889 年，Golgi 用银染法在猫头鹰的神经细胞内观察到了清晰的结构，因此定名为高尔基体。20 世纪 50 年代以后才正确认识它的存在和结构。

一、形态与组成

是由数个扁平囊泡堆在一起形成的高度有极性的细胞器。常分布于内质网与细胞膜之间，呈弓形或半球形，凸出的一面对着内质网称为形成面（forming face）或顺面（cis face）。凹进的一面对着质膜称为成熟面（mature face）或反面（trans face）。顺面和反面都有一些或大或小的运输小泡（图 6-24），在具有极性的细胞中，高尔基体常大量分布于分泌端的细胞质中（图 6-25）。

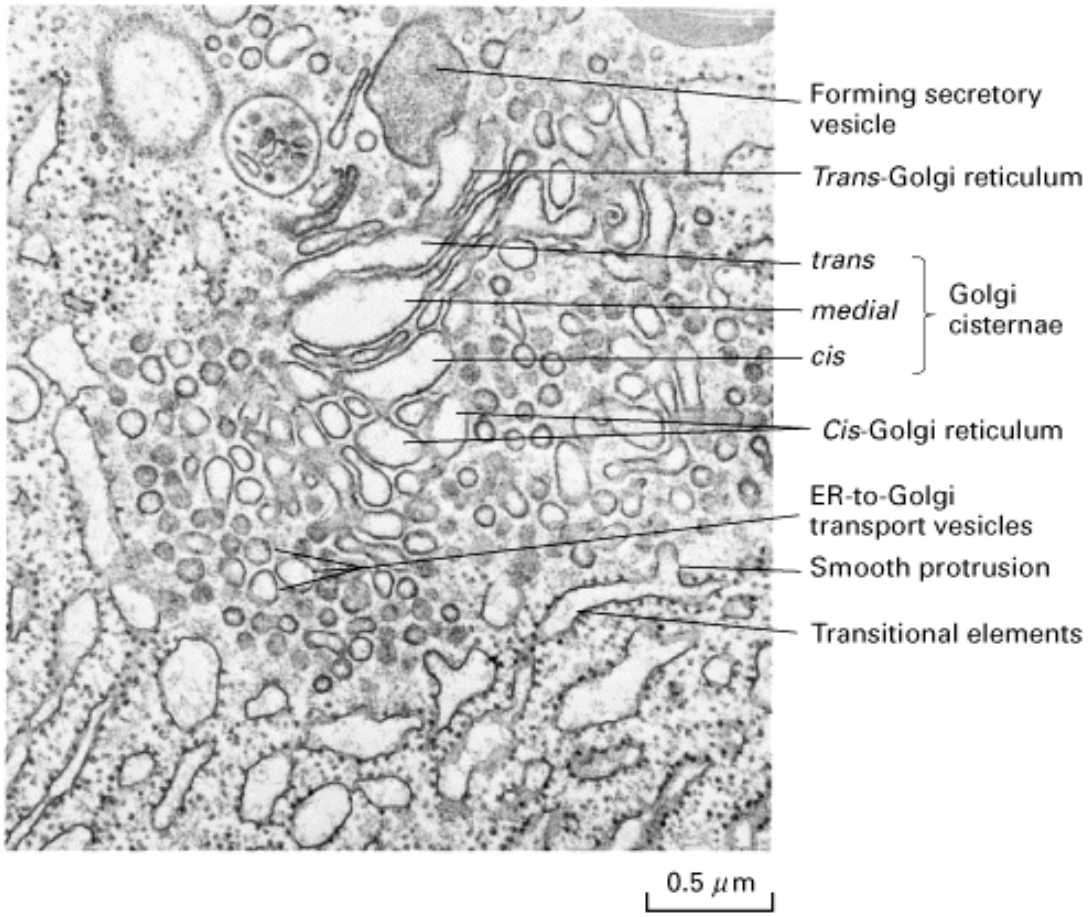


图 6-24 高尔基体各部分的名称

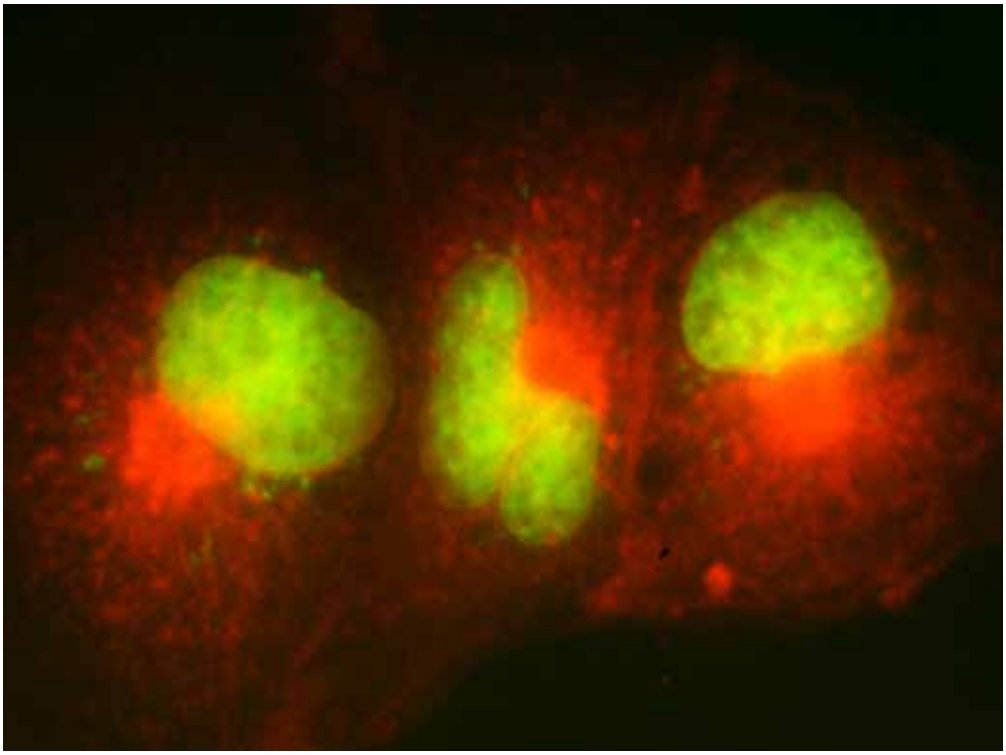


图 6-25 培养的上皮细胞中高尔基体的分布（高尔基体为红色，核为绿色） 引自 http://www.itg.uiuc.edu/

扁平囊直径的 1um，由单层膜构成，膜厚 6~7nm，中间形成囊腔，周缘多呈泡状，4~8 个扁平囊在一起，某些藻类可达一二十个，构成高尔基体的主体，称为高尔基堆（Golgi stack）。

高尔基体膜含有大约 60%的蛋白和 40%的脂类，具有一些和 ER 共同的蛋白成分。膜脂中磷脂酰胆碱的含量介于 ER 和质膜之间，中性脂类主要包括胆固醇，胆固醇酯和甘油三酯。高尔基体中的酶主要有糖基转移酶、磺基-糖基转移酶、氧化还原酶、磷酸酶、蛋白激酶、甘露糖苷酶、转移酶和磷脂酶等不同的类型。

二、功能区隔

高尔基体顺面的网络结构（cis Golgi network，CGN），是高尔基体的入口区域，接受由内质网合成的物质并分类后转入中间膜囊。

高尔基体中间膜囊（medial Gdgi），多数糖基修饰，糖脂的形成以及与高尔基体有关的糖合成均发生此处。

高尔基体反面的网络结构（trans Golgi network，TGN），由反面一侧的囊泡和网管组成，是高尔基体的出口区域，功能是参与蛋白质的分类与包装，最后输出。

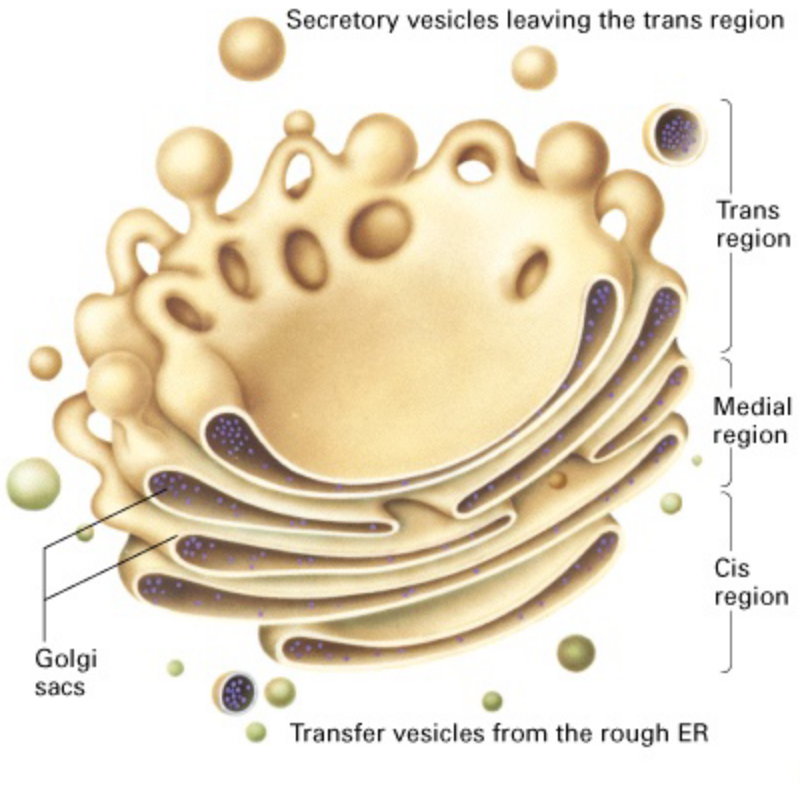


图 6-26 高尔基体的三个功能区域

高尔基体各部分膜囊具有不同的细胞化学反应：①嗜锇反应，经锇酸浸染后，高尔基体的 cis 面膜囊被特异地染色；②焦磷酸硫胺素酶(TPP 酶)的细胞化学反应，可特异地显示高尔基体的 trans 面的 1～2 层膜囊；③烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸酶(NADP 酶)的细胞化学反应，是高尔基体中间几层扁平囊的标志反应；④胞嘧啶单核苷酸酶(CMP 酶)的细胞化学反应，常常可显示靠近 trans 面上的一些膜囊状和管状结构，CMP 酶也是溶酶体的标志酶，溶酶体就是在此处分泌产生的。

三、主要功能

高尔基体的主要功能将内质网合成的蛋白质进行加工、分类、与包装，然后分门别类地送到细胞特定的部位或分泌到细胞外。

1、蛋白质的糖基化

N-连接的糖链合成起始于内质网，完成与高尔基体。在内质网形成的糖蛋白具有相似的糖链，由 Cis 面进入高尔基体后，在各膜囊之间的转运过程中，发生了一系列有序的加工和修饰，原来糖链中的大部分甘露糖被切除，但又被多种糖基转移酶依次加上了不同类型的糖分子，形成了结构各异的寡糖链。糖蛋白的空间结构决定了它可以和那一种糖基转移酶结合，发生特定的糖基化修饰。

许多糖蛋白同时具有 N-连接的糖链和 O-连接的糖链。O-连接的糖基化在高尔基体中进行，通常的一个连接上去的糖单元是 N-乙酰半乳糖，连接的部位为 Ser、

Thr 和 Hyp 的 OH 基团，然后逐次将糖基转移到上去形成寡糖链，糖的供体同样为核苷糖，如 UDP-半乳糖。糖基化的结果使不同的蛋白质打上不同的标记，改变多肽的构象和增加蛋白质的稳定性。

在高尔基体上还可以将一至多个氨基聚糖链通过木糖安装在核心蛋白的丝氨酸残基上，形成蛋白聚糖。这类蛋白有些被分泌到细胞外形成细胞外基质或粘液层，有些锚定在膜上。

2、参与细胞分泌活动

负责对细胞合成的蛋白质进行加工，分类，并运出，其过程是 SER 上合成蛋白质→进入 ER 腔→以出芽形成囊泡→进入 CGN→在 medial Gdgi 中加工→在 TGN 形成囊泡→囊泡与质膜融合、排出。

高尔基体对蛋白质的分类，依据的是蛋白质上的信号肽或信号斑。

3、进行膜的转化功能

高尔基体的膜无论是厚度还是在化学组成上都处于内质网和质膜之间，因此高尔基体在进行着膜转化的功能，在内质网上合成的新膜转移至高尔基体后，经过修饰和加工，形成运输泡与质膜融合，使新形成的膜整合到质膜上。

4、将蛋白水解为活性物质

如将蛋白质 N 端或 C 端切除，成为有活性的物质（胰岛素 C 端）或将含有多个相同氨基序列的前体水解为有活性的多肽，如神经肽。

5、参与形成溶酶体。

6、参与植物细胞壁的形成。

7、合成植物细胞壁中的纤维素和果胶质。

第五节 溶酶体与过氧化物酶体

一、溶酶体的结构

1955 年 de Duve 与 Novikoff 首次发现溶酶体（lysosome）。它是单层膜围绕、内含多种酸性水解酶类的囊泡状细胞器，其主要功能是进行细胞内消化。

具有异质性，形态大小及内含的水解酶种类都可能有很大的不同，标志酶为酸性磷酸酶。根据完成其生理功能的不同阶段可分为初级溶酶体（primary lysosome），次级溶酶体（secondary lysosome）和残体（residual body）。

1、初级溶酶体

直径约 0.2~0.5um 膜厚 7.5nm，内含物均一，无明显颗粒，是高尔基体分泌形成的（图 6-27）。含有多种水解酶，但没有活性，只有当溶酶体破裂，或其它物质进入，才有酶活性。其水解酶包括蛋白酶，核酸酶、脂酶、磷酸酶、硫酸酯酶、磷脂酶类，已知 60 余种，这些酶均属于酸性水解酶，反应的最适 PH 值为 5 左右，溶酶体膜虽然与质膜厚度相近，但成分不同，主要区别是：①膜有质子泵，将 H^+ 泵入溶酶体，使其 PH 值降低。②膜蛋白高度糖基化，可能有利于防止自身膜蛋白降解。

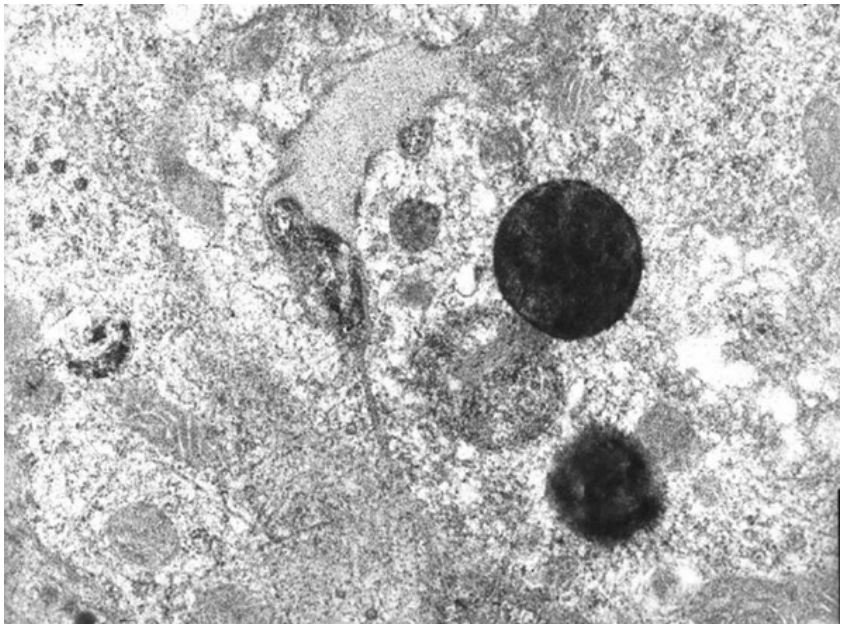


图 6-27 初级溶酶体 引自 http://www.uni-mainz.de

2、次级溶酶体

这些都是消化泡（图 6-28），正在进行或完成消化作用的溶酶体，内含水解酶和相应的底物，可分为异噬溶酶体（phagolysosome）和自噬溶酶体（autophagolysosome），前者消化的物质来自外源，后者消化的物质来自细胞本身的各种组分。

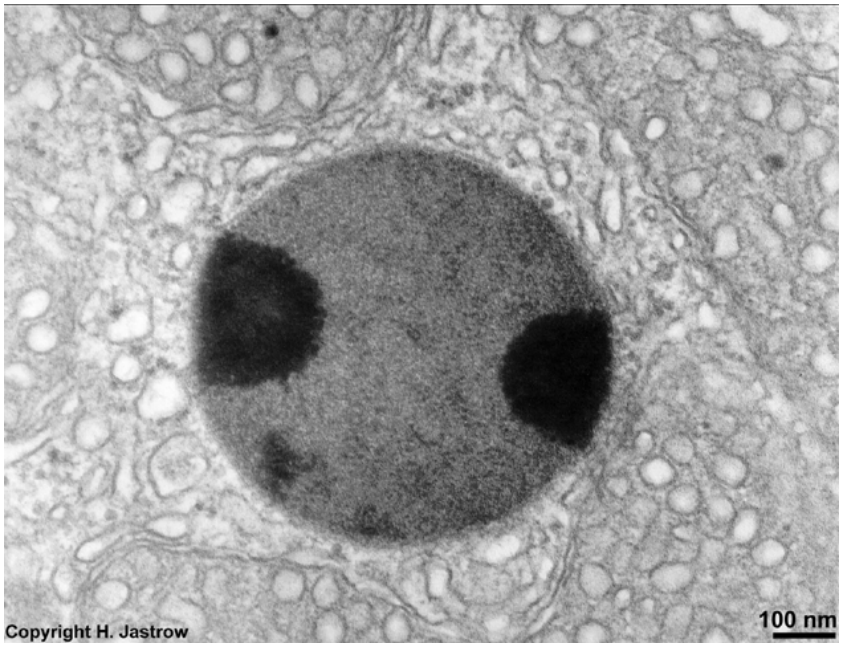


图 6-28 次级溶酶体 引自 http://www.uni-mainz.de

3、残体

又称后溶酶体（post-lysosome）已失去酶活性，仅留未消化的残渣故名，残体可通过外排作用排出细胞，也可能留在细胞内逐年增多，如肝细胞中的脂褐质（图

6-29）。

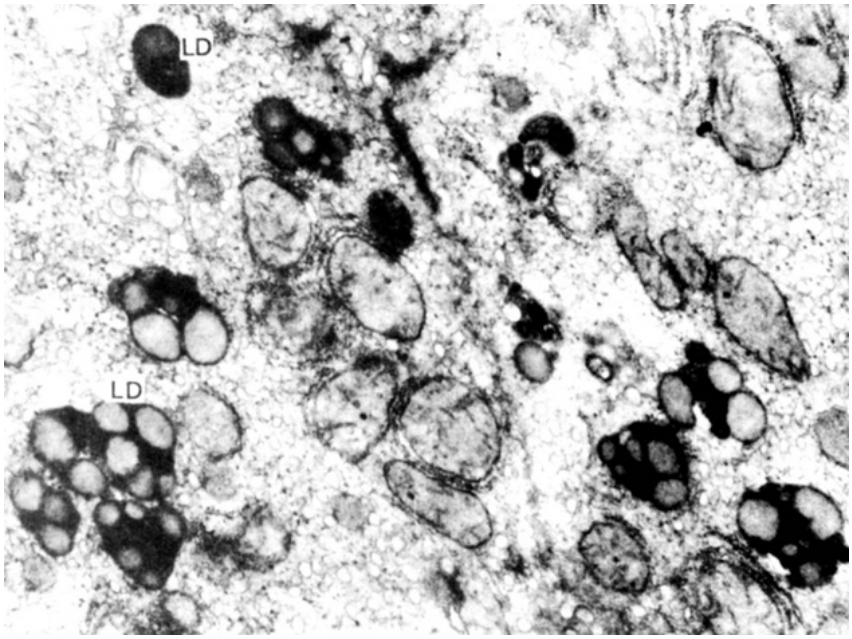


图 6-29 肝细胞中的脂褐质 引自《细胞生物学超微结构图谱》1989

二、溶酶体的功能

溶酶体的主要作用消化作用，是细胞内的消化器官，细胞自溶，防御以及对某些物质的利用均与溶酶体的消化作用有关。

细胞内消化：对高等动物而言细胞的营养物质主要来源于血液中的水分子物质，而一些大分子物质通过内吞作用进入细胞，如内吞低密脂蛋白获得胆固醇，对一些单细胞真核生物，溶酶体的消化作用就更为重要了。

细胞凋亡：个体发生过程中往往涉及组织或器官的改造或重建，如昆虫和蛙类的变态发育等等。这一过程是在基因控制下实现的，称为程序性细胞死亡，注定要消除的细胞以出芽的形式形成凋亡小体，被巨噬细胞吞噬并消化。

自体吞噬：清除细胞中无用的生物大分子，衰老的细胞器等，如许多生物大分子的半衰期只有几小时至几天，肝细胞中线粒体的平均寿命约 10 天左右。

防御作用：如巨噬细胞可吞入病原体，在溶酶体中将病原体杀死和降解。

参与分泌过程的调节，如将甲状腺球蛋白降解成有活性的甲状腺素。

形成精子的顶体：顶体相当于一个化学钻，可溶穿卵子的皮层，使精子进入卵子。

三、溶酶体的发生

初级溶酶体是在高尔基体的 trans 面以出芽的形式形成的，其形成过程如下。

内质网上核糖体合成溶酶体蛋白→进入内质网腔进行 N-连接的糖基化修饰→

进入高尔基体 Cis 面膜囊→N-乙酰葡糖胺磷酸转移酶识别溶酶体水解酶的信号斑→将 N-乙酰葡糖胺磷酸转移在 1~2 个甘露糖残基上→在中间膜囊切去 N-乙酰葡糖胺形成 M6P 配体→与 trans 膜囊上的受体结合→选择性地包装成初级溶酶体。

四、溶酶体与疾病

1．矽肺

二氧化硅尘粒（矽尘）吸入肺泡后被巨噬细内吞噬，含有矽尘的吞噬小体与溶酶体合并成为次级溶酶体。二氧化硅的羟基与溶酶体膜的磷脂或蛋白形成氢键，导致吞噬细胞溶酶体崩解，细胞本身也被破坏，矽尘释出，后又被其他巨噬细内吞噬，如此反复进行。受损或已破坏的巨噬细胞释放“致纤维化因子”，并激活成纤维细胞，导致胶原纤维沉积，肺组织纤维化。

2．肺结核

结核杆菌不产生内、外毒素，也无荚膜和侵袭性酶。但是菌体成分硫酸脑苷脂能抵抗胞内的溶菌杀伤作用，使结核杆菌在肺泡内大量生长繁殖，导致巨噬细胞裂解，释放出的结核杆菌再被吞噬而重复上述过程，最终引起肺组织钙化和纤维化。

3．各类贮积症

贮积症（storage disease）是由于遗传缺陷引起的，由于溶酶体的酶发生变异，功能丧失，导致底物在溶酶体中大量贮积，进而影响细胞功能，常见的贮积症主要有以下几类。

台-萨氏综合征（Tay-Sachs diesease）：要叫黑蒙性家族痴呆症，溶酶体缺少氨基已糖酯酶 A（β-N-hexosaminidase），导致神经节甘脂 GM2 积累（图 6-30），影响细胞功能，造成精神痴呆，2~6 岁死亡。患者表现为渐进性失明、病呆和瘫痪，该病主要出现在犹太人群中。

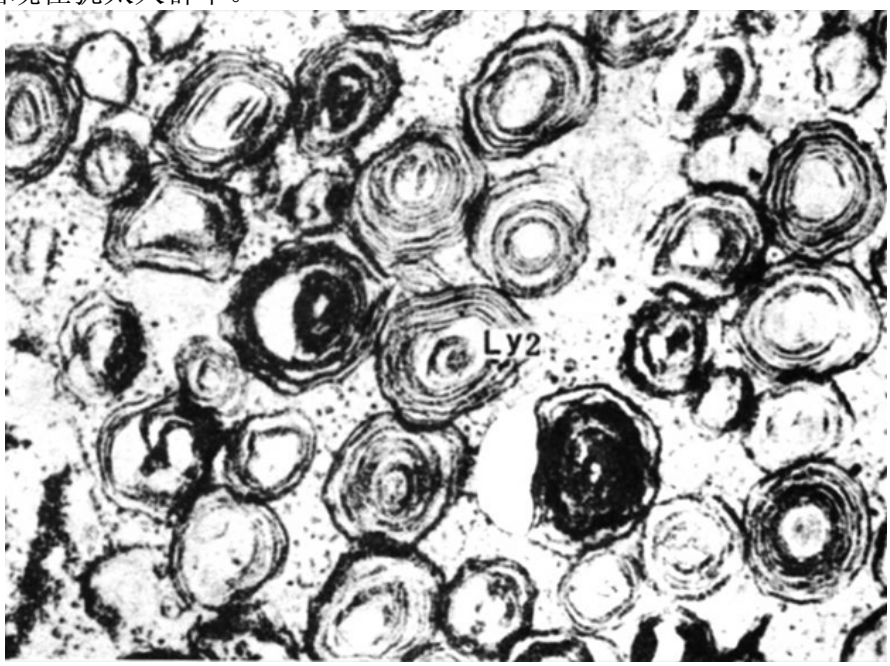


图 6-30 台-萨氏综合征神经元中同心圆状的溶酶体 引自《细胞生物学超微结构图谱》1989

II 型糖原累积病（Pompe 病）：溶酶体缺乏 α-1,4-葡萄糖苷酶，糖原在溶酶体中积累，导致心、肝、舌肿大和骨骼肌无力。属常染色体缺陷性遗传病，患者多为小孩，常在两周岁以前死亡。

Gaucher 病：又称脑苷脂沉积病,是巨噬细胞和脑神经细胞的溶酶体缺乏 β- 葡萄糖苷酶造成的。大量的葡萄糖脑苷脂沉积在这些细胞溶酶体内,巨噬细胞变成 Gaucher 细胞，患者的肝、脾、淋巴结等肿大，中枢神经系统发生退行性变化，常在 1 岁内死亡。

细胞内含物病（inclusion-cell disease，I-cell disease）：一种更严重的贮积症，是 N-乙酰葡糖胺磷酸转移酶单基因突变引起的。由于基因突变，高尔基体中加工的溶酶体前酶上不能形成 M6P 分选信号，酶被运出细胞（default pathway）。这类病人成纤维细胞的溶酶体中没有水解酶，导致底物在溶酶体中大量贮积，形成所谓的“包涵体（inclusion）”。另外这类病人肝细胞中有正常的溶酶体，说明溶酶体形成还具有 M6P 之外的途径。

4．类风湿性关节炎

溶酶体膜很易脆裂，其释放的酶导致关节组织损伤和发炎 。

五、过氧化物酶体

过氧化物酶体（peroxisome）又称微体（microbody），由J. Rhodin（1954）首次在鼠肾小管上皮细胞中发现。是一种具有异质性的细胞器，在不同生物及不同发育阶段有所不同。直径约0.2~1.5um，通常为0.5um，呈圆形，椭圆形或哑呤形不等，由单层膜围绕而成（图6-31）。共同特点是内含一至多种依赖黄素（flavin）的氧化酶和过氧化氢酶（标志酶），已发现40多种氧化酶，如L-氨基酸氧化酶，D-氨基酸氧化酶等等，其中尿酸氧化酶（urate oxidase）的含量极高，以至于在有些种类形成酶结晶构成的核心（图6-32）。

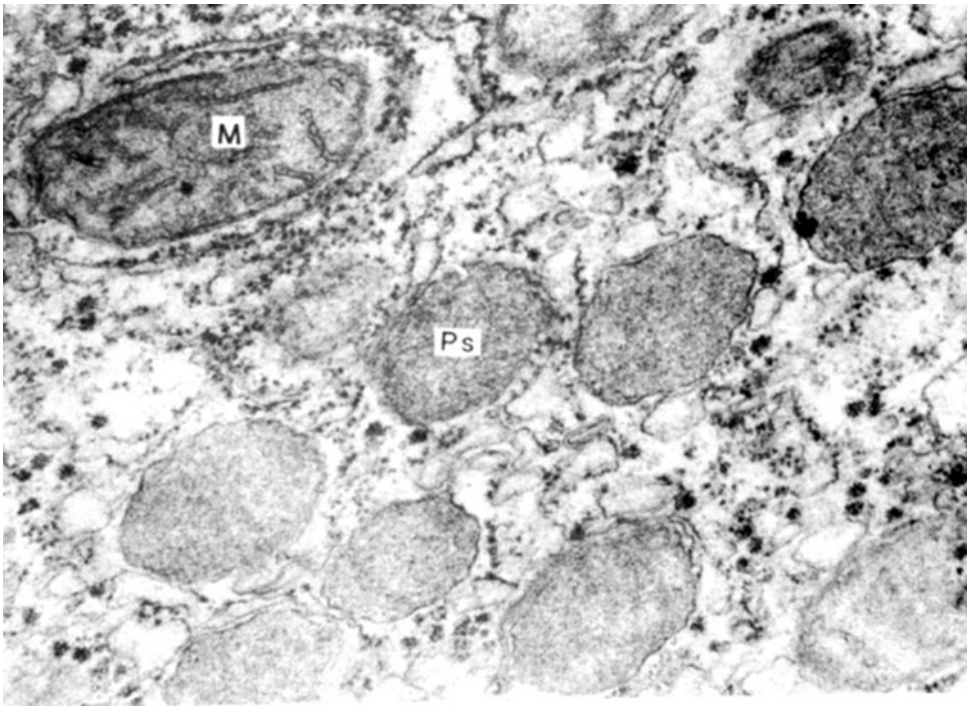
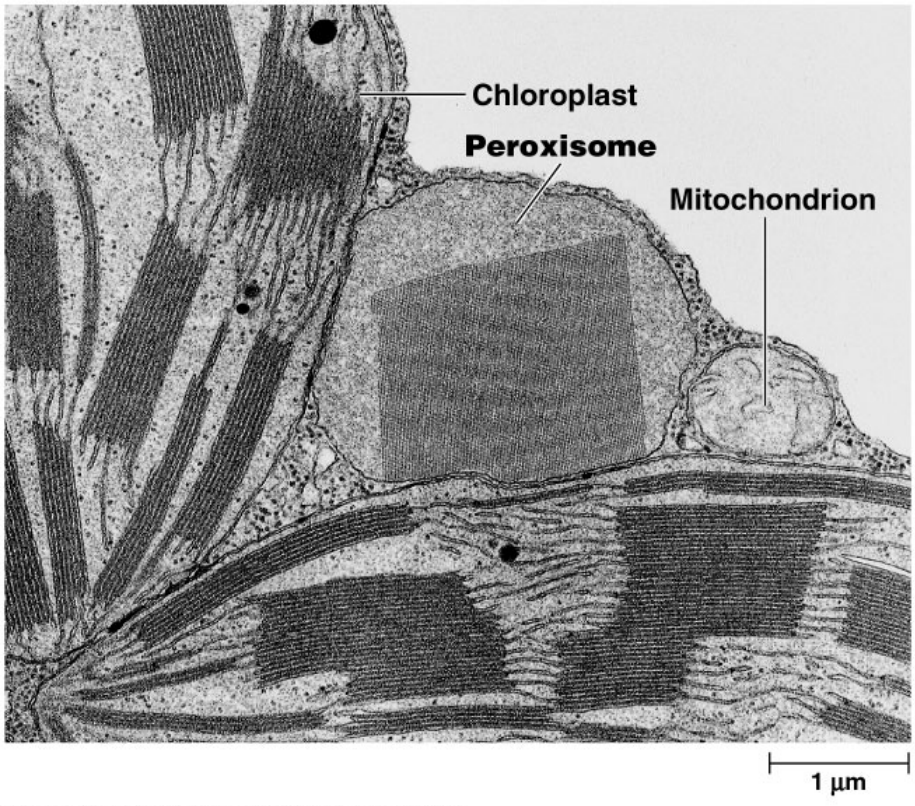


图 6-31 人肝细胞过氧化物酶体（Ps，没有尿酸氧化酶结晶） 引自《细胞生物学超微结构图谱》1989



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

图6-32 烟草叶肉细胞的过氧化物酶体（中央具有尿酸氧化酶形成的晶体状核心）

各类氧化酶的共性是将底物氧化后，生成过氧化氢。

$$RH_2+O_2 \rightarrow R+H_2O_2$$

过氧化氢酶又可以利用过氧化氢，将其它底物（如醛、醇、酚）氧化。

$$R'H_2+H_2O_2 \rightarrow R'+2H_2O$$

此外当细胞中的过剩时，过氧化氢酶亦可催化以下反应：

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

在动物中过氧化物酶体参与脂肪酸的 β 氧化（另一细胞器是线粒体），大鼠肝细胞过氧化物酶体在服用降脂灵后，酶浓度升高 10 倍。此外过氧化物酶体还具有解毒作用，因为过氧化氢酶能利用 H_2O_2 将酚、甲醛、甲酸和醇等有害物质氧化，饮入的酒精 1/4 是在过氧化物酶体中氧化为乙醛。

在植物中过氧化物酶体主要有：①参与光呼吸作用，将光合作用的副产物乙醇酸氧化为乙醛酸和过氧化氢，②在萌发的种子中，进行脂肪的 β-氧化，产生乙酰辅酶 A，经乙醛酸循环，由异柠檬酸裂解为乙醛酸和琥珀酸，加入三羧酸循环，因涉及乙醛酸循环，又称乙醛酸循环体（glyoxysome）。

从系统发生的角度来看，过氧化物酶体可能是一种古老的细胞器，在光合生物出现后，大气中的氧含量逐渐提高，而细胞内的氧对早期的生物具有毒害作用，过氧化物酶体的功能就是消除细胞内的氧，并产生细胞所需要的某些代谢物。虽然在过氧化物酶体中黄素蛋白、氧化酶和过氧化氢酶之间可以形成一个简单的呼吸链，但不起能量转换的作用。后来线粒体产生后就取代了过氧化物酶体的这种功能，并且其电子传递与 ATP 合成相偶联。

从个体发生的角度来看，过氧化物酶体来源于已存在过氧化物酶体的分裂。过氧化物酶体中所有的酶都由核基因编码，在细胞质基质中合成，在信号肽的引导下，进入过氧化物酶体，引导蛋白质进入过氧化物酶体的信号序列是 -Ser-Lys-Leu-COO-。但对于过氧化物酶体膜上与蛋白输入有关的受体和转位因子了解甚少，至少和 23 种被称为 peroxin 的蛋白有关，其机理显著不同于线粒体和叶绿体的蛋白转运，如受体 Pex5（一种 peroxin）是伴随着货物进入过氧化物酶体的，然后再返回细胞质。

Zellweger 综合征是一类与过氧化物酶体有关的遗传病，也叫脑肝肾综合征，患者细胞的过氧化物酶体中，酶蛋白输入有关的蛋白质变异，过氧化物酶体是“空的”。脑、肝、肾异常，出生 3-6 个内后死亡。

第七章 线粒体与叶绿体

第一节 线粒体

1890 年 R. Altaman 首次发现线粒体，命名为 bioblast，以为它可能是共生于细胞内独立生活的细菌。

1898 年 Benda 首次将这种颗命名为 mitochondrion。

1900 年 L. Michaelis 用 Janus Green B 对线粒体进行染色，发现线粒体具有氧化作用。

Green（1948）证实线粒体含所有三羧酸循环的酶，Kennedy 和 Lehninger（1949）发现脂肪酸氧化为 CO_2 的过程是在线粒体内完成的，Hatefi 等（1976）纯化了呼吸链四个独立的复合体。Mitchell（1961－1980）提出了氧化磷酸化的化学偶联学说。

一、结构

（一）形态与分布

线粒体一般呈粒状或杆状，但因生物种类和生理状态而异，可呈环形，哑铃形、线状、分杈状或其它形状。主要化学成分是蛋白质和脂类，其中蛋白质占线粒体干重的 65-70%，脂类占 25-30%。

一般直径 0.5~1μm，长 1.5~3.0μm，在胰脏外分泌细胞中可长达 10~20μm，称巨线粒体。

数目一般数百到数千个，植物因有叶绿体的缘故，线粒体数目相对较少；肝细胞约 1300 个线粒体，占细胞体积的 20%；单细胞鞭毛藻仅 1 个，酵母细胞具有一个大型分支的线粒体，巨大变形中达 50 万个；许多哺乳动物成熟的红细胞中无线粒体。

通常结合在维管上，分布在细胞功能旺盛的区域。如在肝细胞中呈均匀分布，在肾细胞中靠近微血管，呈平行或栅状排列，肠表皮细胞中呈两极性分布，集中在顶端和基部，在精子中分布在鞭毛中区。线粒体在细胞质中可以向功能旺盛的区域迁移，微管是其导轨，由马达蛋白提供动力。

（二）超微结构

线粒体由内外两层膜封闭，包括外膜、内膜、膜间隙和基质四个功能区隔（图7-1、7-2）。在肝细胞线粒体中各功能区隔蛋白质的含量依次为：基质 67%，内膜21%，外 8%膜，膜间隙 4%。

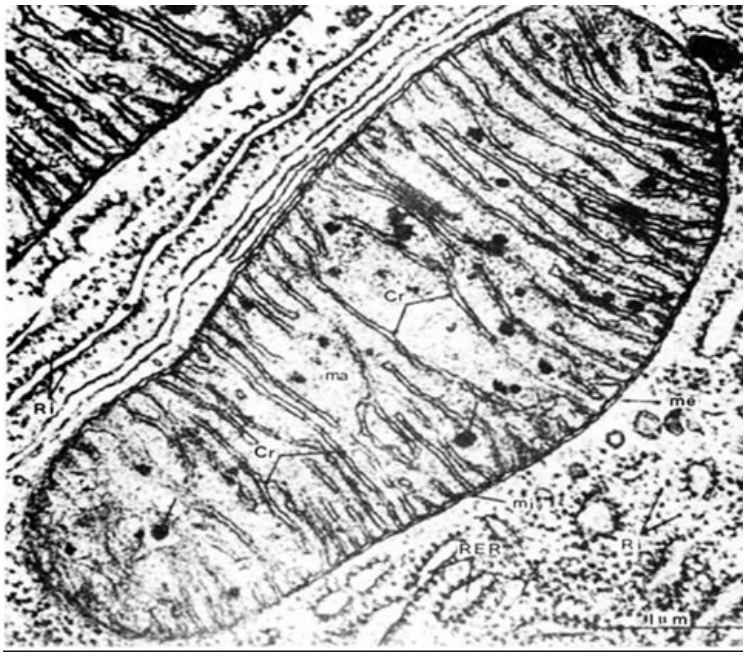


图 7-1 线粒体的 TEM 照片

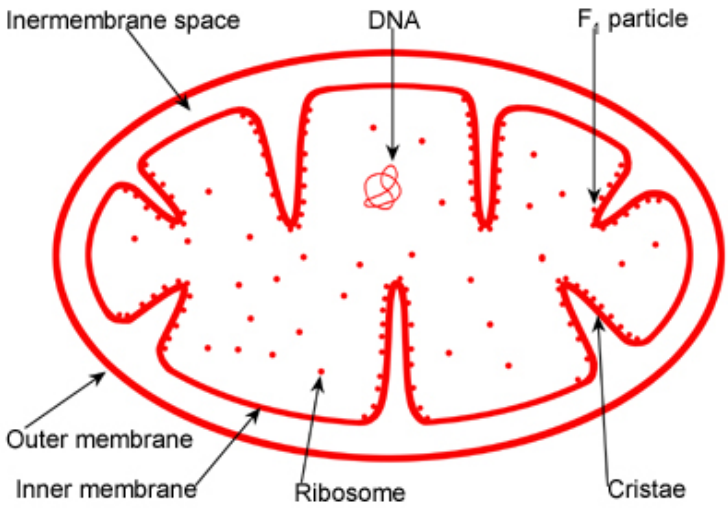


图 7-2 线粒体结构模型

1、外膜 (out membrane)

含 40%的脂类和 60%的蛋白质，具有孔蛋白（porin）构成的亲水通道，允许分子量为 5KD 以下的分子通过，1KD 以下的分子可自由通过。标志酶为单胺氧化酶。

2、内膜 （inner membrane）

含 100 种以上的多肽，蛋白质和脂类的比例高于 3:1。心磷脂含量高（达 20%）、缺乏胆固醇，类似于细菌。通透性很低，仅允许不带电荷的小分子物质通过，大分子和离子通过内膜时需要特殊的转运系统。如：丙酮酸和焦磷酸是利用 H^+梯度协同运输。

线粒体氧化磷酸化的电子传递链位于内膜，因此从能量转换角度来说，内膜起主要的作用。内膜的标志酶为细胞色素 C 氧化酶。

内膜向线粒体基质褶入形成嵴（cristae），嵴能显著扩大内膜表面积（达 5~10 倍），嵴有两种类型：①板层状（图 7-1）、②管状（图 7-3），但多呈板层状。

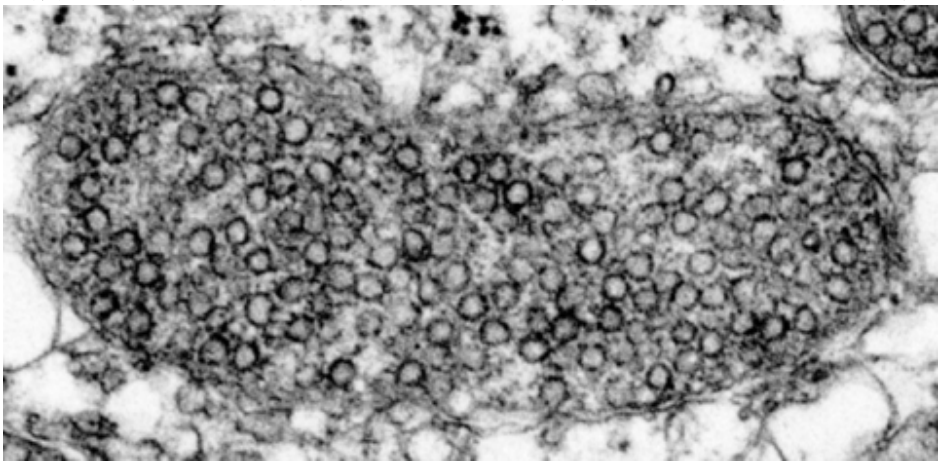


图 7-3 管状嵴线粒体

嵴上覆有基粒（elementary particle），基粒由头部（F_1 偶联因子）和基部（F_0 偶联因子）构成，F_0 嵌入线粒体内膜。

3、膜间隙(intermembrane space)

是内外膜之间的腔隙，延伸至嵴的轴心部，腔隙宽约 6-8nm。由于外膜具有大量亲水孔道与细胞质相通，因此膜间隙的 pH 值与细胞质的相似。标志酶为腺苷酸激酶。

4、基质（matrix）

为内膜和嵴包围的空间。除糖酵解在细胞质中进行外，其他的生物氧化过程都在线粒体中进行。催化三羧酸循环，脂肪酸和丙酮酸氧化的酶类均位于基质中，其标志酶为苹果酸脱氢酶。

基质具有一套完整的转录和翻译体系。包括线粒体 DNA（mtDNA），70S 型核糖体，tRNAs 、rRNA、DNA 聚合酶、氨基酸活化酶等。

基质中还含有纤维丝和电子密度很大的致密颗粒状物质，内含 Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}等离子。

二、氧化磷酸化的分子基础

（一）电子载体

呼吸链电子载体主要有：黄素蛋白、细胞色素、铜原子、铁硫蛋白、辅酶 Q 等。

1. NAD

即烟酰胺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide，图 7-4），是体内很多脱氢酶的辅酶，连接三羧酸循环和呼吸链，其功能是将代谢过程中脱下来的氢交给黄素蛋白。

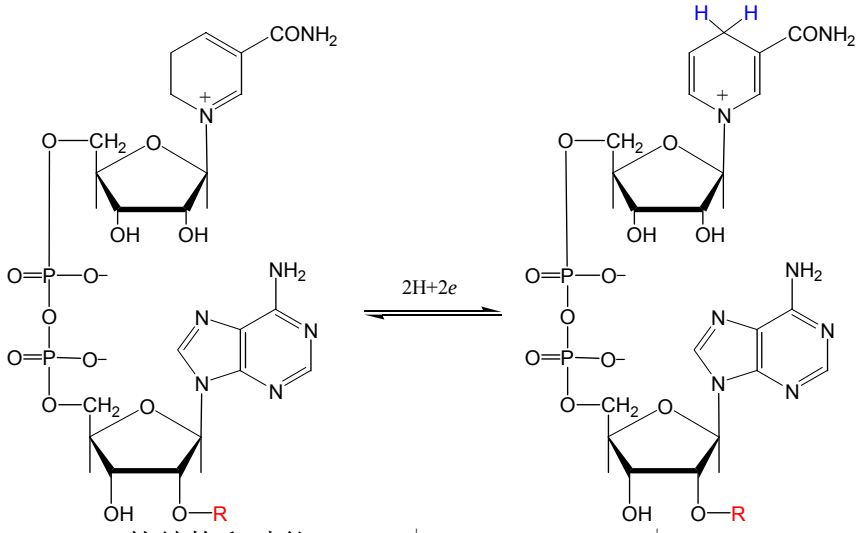


图 7-4 NAD 的结构和功能（NAD^+：R＝H，$NADP^+$：R＝－PO_3H_2）

2. 黄素蛋白：含 FMN（图 7-5）或 FAD（图 7-6）的蛋白质，每个 FMN 或 FAD 可接受 2 个电子 2 个质子。呼吸链上具有 FMN 为辅基的 NADH 脱氢酶，以 FAD 为辅基的琥珀酸脱氢酶。

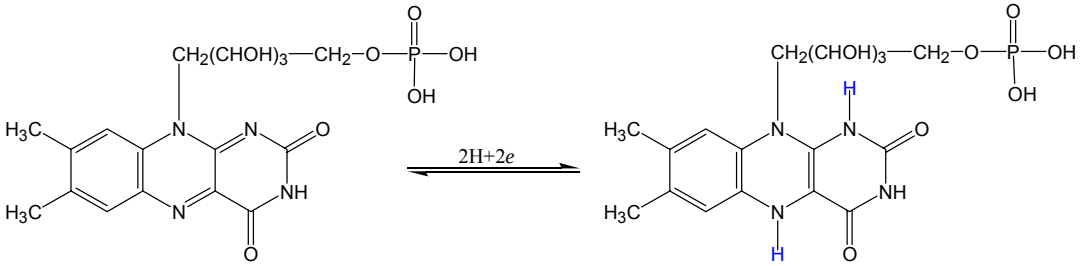


图 7-5 FMN (flavin mononucleotide) 的分子结构

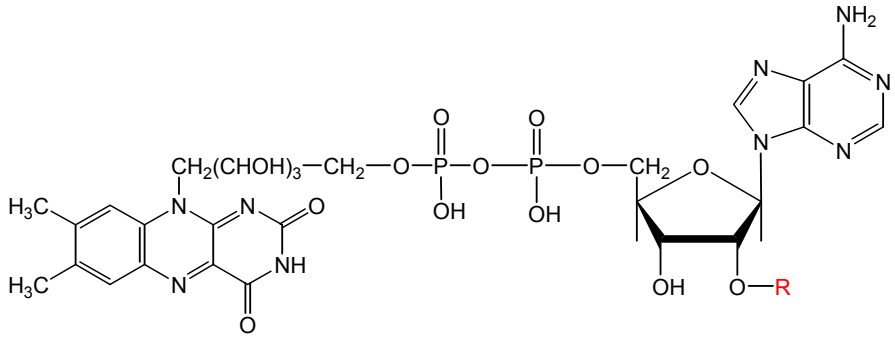


图 7-6 FAD (flavin adenine dinucleotide)的分子结构

3. 细胞色素：分子中含有血红素铁（图 7-7），以共价形式与蛋白结合，通 Fe^{3+}、Fe^{2+}形式变化传递电子，呼吸链中有 5 类，即：细胞色素 a、a_3、b、c、c_1，其中 a、a_3 含有铜原子。

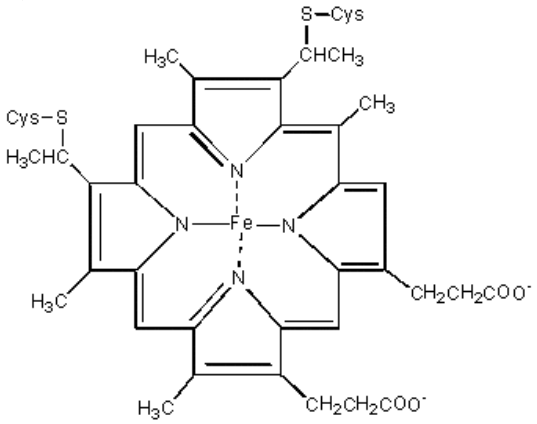


图 7-7 血红素 c 的结构

4. 三个铜原子：位于线粒体内膜的一个蛋白质上，形成类似于铁硫蛋白的结构，通过 Cu^{2+}、Cu^{1+}的变化传递电子。
5. 铁硫蛋白：在其分子结构中每个铁原子和 4 个硫原子结合，通过 Fe^{2+}、Fe^{3+}互变进行电子传递，有 2Fe-2S 和 4Fe-4S 两种类型（图 7-8）。

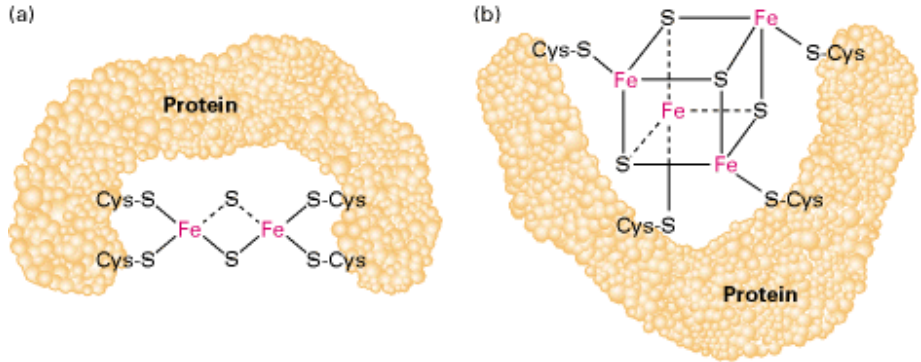


图 7-8 铁硫蛋白的结构（(引自 Lodish 等 1999)）

6. 辅酶 Q：是脂溶性小分子量的醌类化合物，通过氧化和还原传递电子（图 7-9）。有 3 种氧化还原形式即氧化型醌 Q，还原型氢醌（QH_2）和介于两者之者的自由基半醌（QH）。

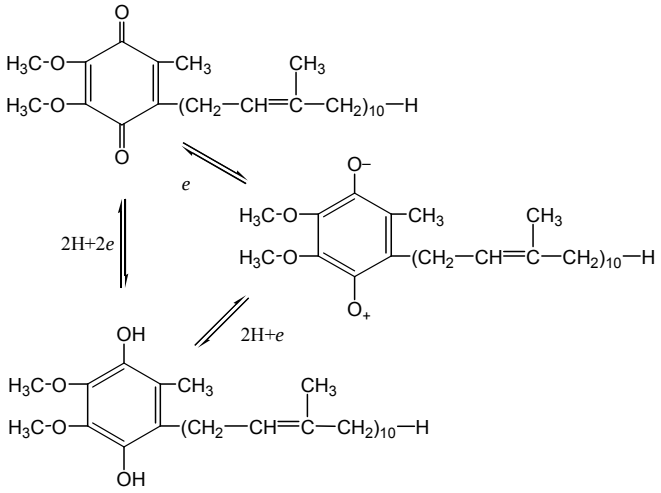


图 7-9 辅酶 Q

（二）呼吸链的复合物

利用脱氧胆酸（deoxycholate，一种离子型去污剂）处理线粒体内膜、分离出呼吸链的 4 种复合物，即复合物 I 、II 、III和IV，辅酶 Q 和细胞色素 C 不属于任何一种复合物。辅酶 Q 溶于内膜、细胞色素 C 位于线粒体内膜的 C 侧，属于膜的外周蛋白。

1、复合物 I

即 NADH 脱氢酶，哺乳动物的复合物 I 由 42 条肽链组成，呈 L 型，含有一个 FMN 和至少 6 个铁硫蛋白，分子量接近 1MD，以二聚体形式存在，其作用是催化 NADH 的 2 个电子传递至辅酶 Q，同时将 4 个质子由线粒体基质（M 侧）转移至膜间隙（C 侧）。电子传递的方向为：NADH→FMN→Fe-S→Q，总的反应结果为：

$$NADH + 5H^+_M + Q \rightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H^+_C$$

2、复合物 II

即琥珀酸脱氢酶，至少由 4 条肽链组成，含有一个 FAD，2 个铁硫蛋白，其作用是催化电子从琥珀酸转至辅酶 Q，但不转移质子。电子传递的方向为：琥珀酸→FAD→Fe-S→Q。反应结果为：

$$琥珀酸+Q \rightarrow 延胡索酸+QH_2$$

3、复合物 III

即细胞色素 c 还原酶，由至少 11 条不同肽链组成，以二聚体形式存在，每个

单体包含两个细胞色素 b（b_{562}、b_{566}）、一个细胞色素 c_1 和一个铁硫蛋白。其作用是催化电子从辅酶 Q 传给细胞色素 c，每转移一对电子，同时将 4 个质子由线粒体基质泵至膜间隙。总的反应结果为：

$$2 \text{ 还原态 cyt } c_1 + QH_2 + 2\ H^+_M \rightarrow 2 \text{ 氧化态 cyt } c_1 + Q + 4H^+_C$$

复合物III的电子传递比较复杂，和“Q 循环”有关（图 7-10）。辅酶 Q 能在膜中自由扩散，在内膜 C 侧，还原型辅酶 Q（氢醌） 将一个电子交给 Fe-S→细胞色素 c1→细胞色素 c，被氧化为半醌，并将一个质子释放到膜间隙，半醌将电子交给细胞色素 b566→b562，释放另外一个质子到膜间隙。细胞色素 b566 得到的电子为**循环电子**，传递路线为：半醌→b566→b562→辅酶 Q。在内膜 M 侧，辅酶 Q 可被复合体 I （复合体 II ）或细胞色素 b562 还原为氢醌。一对电子由辅酶 Q 到复合物III的电子传递过程中，共有四个质子被转移到膜间隙，其中两个质子是辅酶 Q 转移的。

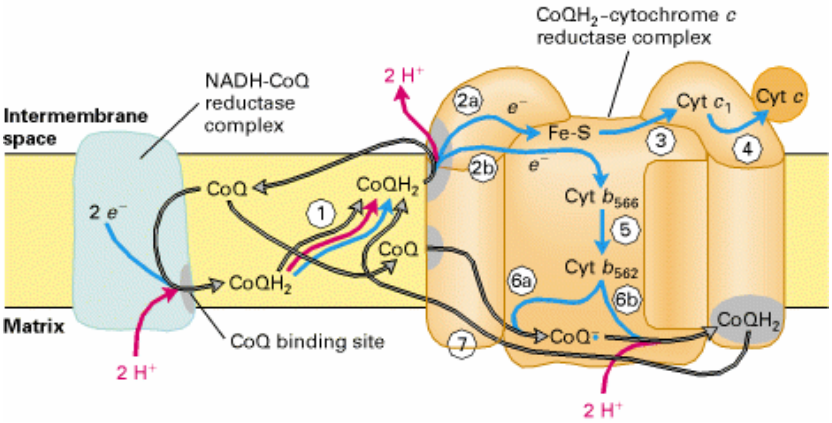


图 7-10 Q 循环示意图 引自 Lodish 等 1999

4、复合物 IV

即细胞色素 c 氧化酶，以二聚体形式存在，其作用是将从细胞色素 c 接受的电子传给氧，每转移一对电子，在基质侧消耗 2 个质子，同时转移 2 个质子至膜间隙。每个单体由至少 13 条不同的肽链组成，分为三个亚单位：亚单位 I（subunit I）：包含两个血红素（a_1、a_3）和一个铜离子(Cu_B)，血红素 a_3 和 Cu_B 形成双核的 Fe-Cu 中心。亚单位 II （subunit II），包含两个铜离子(Cu_A)构成的双核中心，其结构与 2Fe-2S 相似。亚单位III（subunit III）的功能尚不了解。电子传递的路线为：cyt c→Cu_A→heme a→a_3- Cu_B→O_2，总的反应结果为：

$$4 \text{ 还原态 cyt c} + 8\ H^+_M + O_2 \rightarrow 4 \text{ 氧化态 cyt c} + 4H^+_C + 2H_2O$$

（三）两条主要的呼吸链

复合物 I 、III、IV组成主要的呼吸链，催化 NADH 的脱氢氧化，复合物 II 、III、

IV组成另一条呼吸链，催化琥珀酸的脱氢氧化（图 7-11）。对应于每个复合物 I，大约需要 3 个复合物III，7 个复合物IV，任何两个复合物之间没有稳定的连接结构，而是由辅酶 Q 和细胞色素 c 这样的可扩散性分子连接。

呼吸链各组分有序，使电子按氧化还原电位从低向高传递，能量逐级释放，呼吸链中的复合物 I 、III、IV都是质子泵，可将质子有机质转移到膜间隙，形成质子动力势（proton-motive force），驱动 ATP 的合成，实验证明人为提高线粒体膜间隙的质子浓度，能使线粒体合成 ATP。

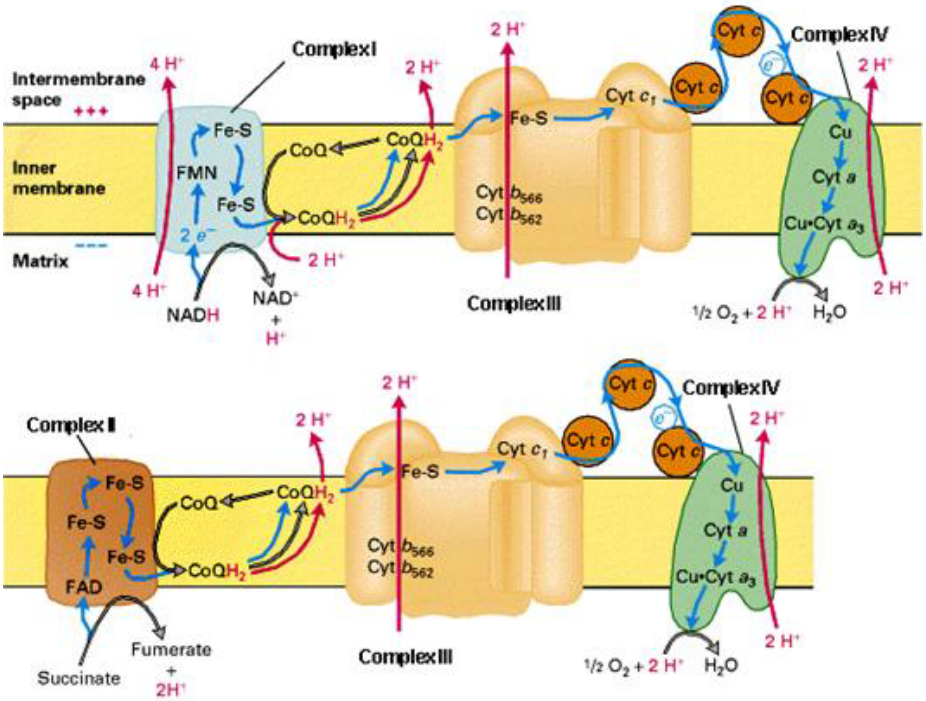


图 7-11 两条主要的呼吸链（引自 Lodish 等 1999）

呼吸链组分及 ATP 酶在线粒体内膜上呈不对称分布，如细胞色素 C 位于线粒体内膜的 C 侧（向细胞质的一侧），而 ATP 酶位于内膜的 M 侧（向线粒体基质的一侧）。

对于呼吸链组分在内膜上的分布主要依靠用亚线粒体颗粒和冰冻能刻电镜技术来研究。

将线粒体用超声波破碎，线粒体内膜碎片可形成颗粒朝外的小膜泡，称亚线粒体小泡或亚线粒体颗粒，这种小泡具有正常的电子传递和磷酸化的功能。用细胞色素 c 的抗体能够抑制完整线粒体的氧化磷酸化，但不能抑制亚线粒体颗粒的氧化磷酸化，说明细胞色素 c 位于线粒体内膜的 C 侧。

三、氧化磷酸化的作用机理

（一）质子动力势

Mitchell P.1961 提出“化学渗透假说(Chemiosmotic Hypothesis)”，70 年代关于化学渗透假说取得大量实验结果的支持，成为一种较为流行的假说，Mitchell 本人也因此获得 1978 年诺贝尔化学奖。

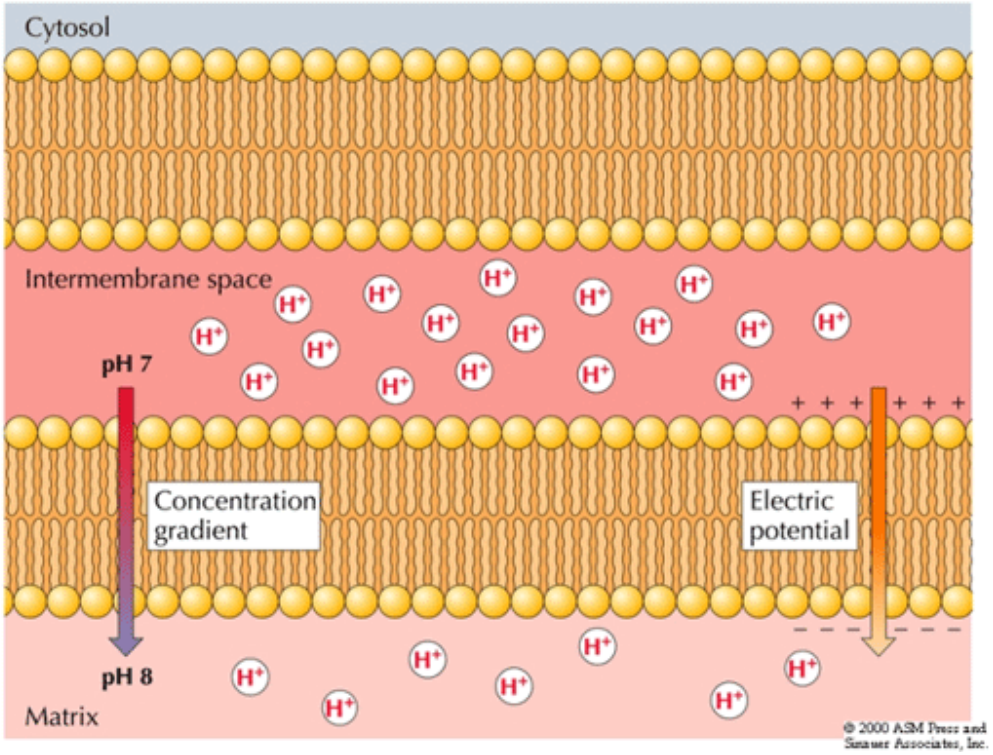


图 7-12 化学渗透学说

根据“化学渗透假说”，当电子沿呼吸链传递时，所释放的能量将质子从内膜基质侧（M 侧）泵至膜间隙（胞质侧或 C 侧），由于线粒体内膜对离子是高度不通透的，从而使膜间隙的质子浓度高于基质，在内膜的两侧形成 pH 梯度（△pH）及电位梯度（Ψ），两者共同构成电化学梯度（图 7-12），即质子动力势（△P）。

$$\triangle P=\Psi-(2.3RT/F)\triangle pH$$

其中 T 为绝对温度，R 为气体常数，F 为法拉第常数。大量实验表明，当温度为 25℃时△P=Ψ-59△pH，△P 的值为 220mV 左右。

质子沿电化学梯度穿过内膜上的 ATP 酶复合物流回基质，使 ATP 酶的构象发生改变，将 ADP 和 Pi 合成 ATP。

（二）ATP 合酶的结构和作用机理

ATP 合酶（ATP synthetase， 图 7-13），分子量 500KD，状如蘑菇。分为球形的 F_1（头部）和嵌入膜中的 F_0（基部），它可以利用质子动力势合成 ATP，也可以水解 ATP，转运质子，属于 F 型质子泵。每个肝细胞线粒体通常含 15000 个 ATP 合酶、每个酶每秒钟可产生 100 个 ATP。

F_1 由 5 种多肽组成 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ 复合体，具有三个 ATP 合成的催化位点（每个 β 亚基具有一个）。α 和 β 单位交替排列，状如桔瓣。γ 贯穿 αβ 复合体（相当于发电机的转子），并与 F_0 接触，ε 帮助 γ 与 F_0 结合。δ 与 F_0 的两个 b 亚基形成固定 αβ 复合体的结构（相当于发电机的定子）。

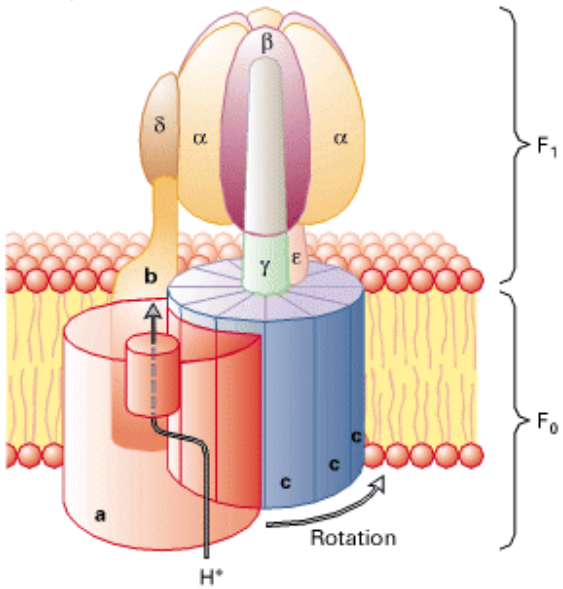


图 7-13 ATP 合酶的结构（引自 Lodish 等 1999）

F_0 由三种多肽组成 ab_2c_{12} 复合体，嵌入内膜，12 个 c 亚基组成一个环形结构，具有质子通道，可使质子由膜间隙流回基质。

1979 年代 Boyer P 提出构象耦联假说，一些有力的实验证据使这一学说得到广泛的认可。其要点如下：

1. ATP 酶利用质子动力势，产生构象的改变，改变与底物的亲和力，催化 ADP 与 Pi 形成 ATP（图 7-14）。

2. F_1 具有三个催化位点，但在特定的时间，三个催化位点的构象不同、因而与核苷酸的亲和力不同。在 L 构象（loose），ADP、 Pi 与酶疏松结合在一起；在 T 构象（tight）底物（ADP、 Pi）与酶紧密结合在一起，在这种情况下可将两者加合在一起；在 O 构象（open）ATP 与酶的亲和力很低，被释放出去。

3. 质子通过 F_0 时，引起 c 亚基构成的环旋转，从而带动 γ 亚基旋转，由于 γ 亚基的端部是高度不对称的，它的旋转引起 β 亚基 3 个催化位点构象的周期性变化（L、T、O），不断将 ADP 和 Pi 加合在一起，形成 ATP。

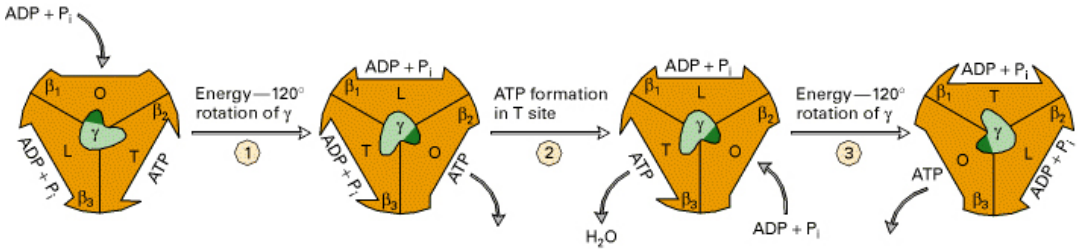


图 7-14 ATP 合酶三种构象的交替改变（引自 Lodish 等 1999）

支持构象耦联假说的实验有：

1．日本的吉田（Massasuke Yoshida）等人将 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 固定在玻片上，在 γ 亚基的顶端连接荧光标记的肌动蛋白纤维，在含有 ATP 的溶液中温育时，在显微镜下可观察到 γ 亚基带动肌动蛋白纤维旋转（图 7-15）。

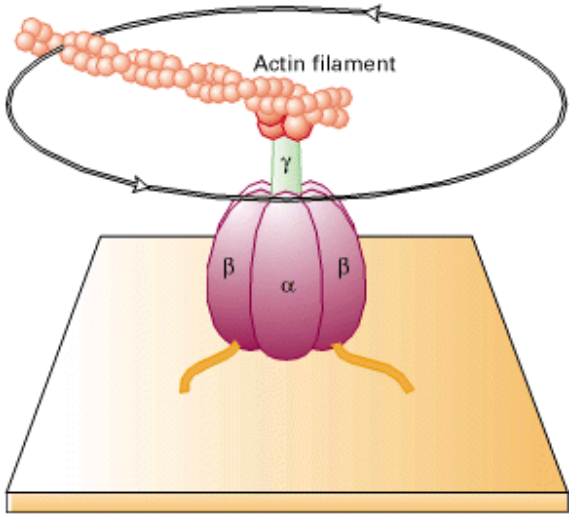


图 7-15 γ 亚基旋转的观察（引自 Lodish 等 1999）

2．在另外一个实验中，将荧光标记的肌动蛋白连接到 ATP 合酶的 F_0 亚基上，在 ATP 存在时同样可以观察到肌动蛋白的旋转。

（三）氧化磷酸化抑制剂

1．电子传递抑制剂

抑制呼吸链的电子传递。包括以下类型：

① 抑制 NADH→CoQ 的电子传递。如：阿米妥(amytal)、鱼藤酮（rotenone）、杀粉蝶素 A（piericidin）。

② 抑制 Cyt b→Cyt c_1 的电子传递。如：抗霉素 A(antinomycin A)。

③ 抑制细胞色素氧化酶→O_2。如：CO、CN、NaN_3、H_2S。

电子传递抑制剂可用来研究呼吸链各组分的排列顺序，当呼吸链某一特定部位被抑制后，底物一侧均为还原状态，氧一侧均为氧化态，可用分光光度计检测，因为电子传递链组分氧化态和还原态具有不同的吸收峰。

2．磷酸化抑制剂

与 F_0 结合结合，阻断 H^+通道，从而抑制 ATP 合成。如：寡霉素（oligomycin）、二环己基碳化二亚胺(dicyclohexyl carbodiimide，DCC)：

3．解偶联剂（uncoupler）

使氧化和磷酸化脱偶联，氧化仍可以进行，而磷酸化不能进行，解偶联剂为离子载体或通道，能增大线粒体内膜对 H^+的通透性，消除 H^+梯度，因而无 ATP 生成，使氧化释放出来的能量全部以热的形式散发。动物棕色脂肪组织和肌肉线粒体中有独特的解偶联蛋白(uncoupling proteins， UCPs)，与维持体温有关。常用解偶联剂主要有：

质子载体：2，4-二硝基酚(DNP，图 7-16)，羰基-氰-对-三氟甲氧基苯肼(FCCP)。

质子通道：增温素（thermogenin）。

其它离子载体：如缬氨霉素。

某些药物：如过量的阿斯匹林也使氧化磷酸化部分解偶联，从而使体温升高。

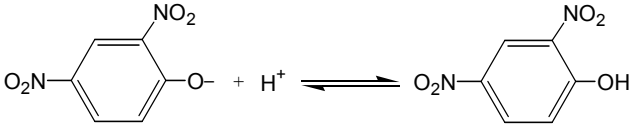


图 7-16 DNP 分子结构

四、线粒体的半自主性

1963 年 M. 和 S. Nass 发现线粒体 DNA（mtDNA）后，人们又在线粒体中发现了 RNA、DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、tRNA、核糖体、氨基酸活化酶等进行 DNA 复制、转录和蛋白质翻译的全套装备，说明线粒体具有独立的遗传体系。

虽然线粒体也能合成蛋白质，但是合成能力有限。线粒体 1000 多种蛋白质中，自身合成的仅十余种。线粒体的核糖体蛋白、氨酰 tRNA 合成酶、许多结构蛋白，都是核基因编码， 在细胞质中合成后，定向转运到线粒体的，因此称线粒体为半自主细胞器。

利用标记氨基酸培养细胞，用氯霉素和放线菌酮分别抑制线粒体和细胞质蛋白质合成的方法，发现人的线粒体 DNA 编码的多肽为细胞色素 c 氧化酶的 3 个亚基，F_0 的 2 个亚基，NADH 脱氢酶的 7 个亚基和细胞色素 b 等 13 条多肽。此外线粒体 DNA 还能合成 12S 和 16SrRNA 及 22 种 tRNA。

mtDNA 分子为环状双链 DNA 分子，外环为重链（H），内环为轻链（L ）。基因排列非常紧凑，除与 mtDNA 复制及转录有关的一小段区域外，无内含子序列。每个线粒体含数个 m tDNA，动物 m tDNA 约 16-20kb，大多数基因由 H 链转录，包括 2 个 rRNA ， 14 个 tRNA 和 12 个编码多肽的 mRNA ， L 链编码另外 8 个 tRNA 和一条多肽链。mtDNA 上的基因相互连接或仅间隔几个核苷酸序列， 一些

多肽基因相互重叠， 几乎所有阅读框都缺少非翻译区域。很多基因没有完整的终止密码， 而仅以 T 或 TA 结尾，mRNA 的终止信号是在转录后加工时加上去的。

线粒体在形态，染色反应、化学组成、物理性质、活动状态、遗传体系等方面，都很像细菌，所以人们推测线粒体起源于内共生。按照这种观点，需氧细菌被原始真核细胞吞噬以后，有可能在长期互利共生中演化形成了现在的线粒体。在进化过程中好氧细菌逐步丧失了独立性，并将大量遗传信息转移到了宿主细胞中，形成了线粒体的半自主性。

线粒体遗传体系确实具有许多和细菌相似的特征，如：①DNA 为环形分子，无内含子；②核糖体为 70S 型；③RNA 聚合酶被溴化乙锭抑制不被放线菌素 D 所抑制；④tRNA、氨酰基-tRNA 合成酶不同于细胞质中的；⑤蛋白质合成的起始氨酰基 tRNA 是 N-甲酰甲硫氨酰 tRNA，对细菌蛋白质合成抑制剂氯霉素敏感对细胞质蛋白合成抑制剂放线菌酮不敏感。

此外哺乳动物 mtDNA 的遗传密码与通用遗传密码有以下区别：①UGA 不是终止信号，而是色氨酸的密码；②多肽内部的甲硫氨酸由 AUG 和 AUA 两个密码子编码，起始甲硫氨酸由 AUG，AUA，AUU 和 AUC 四个密码子编码；③AGA，AGG 不是精氨酸的密码子，而是终止密码子，线粒体密码系统中有 4 个终止密码子（UAA，UAG，AGA，AGG）。

mtDNA 表现为母系遗传。其突变率高于核 DNA，并且缺乏修复能力。有些遗传病，如 Leber 遗传性视神经病，肌阵挛性癫痫等均与线粒体基因突变有关。

五、线粒体的增殖

线粒体的增殖是通过已有的线粒体的分裂，有以下几种形式：

1、间壁分离（图 7-17），分裂时先由内膜向中心皱褶，将线粒体分类两个，常见于鼠肝和植物产生组织中。

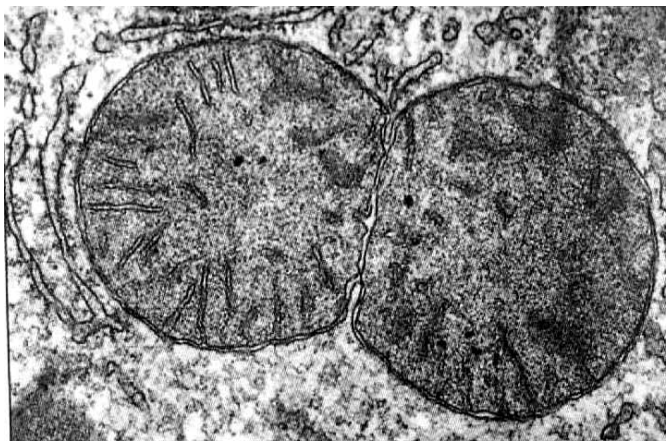


图 7-17 线粒体的间壁分裂

2、收缩后分离（图 7-18），分裂时通过线粒体中部缢缩并向两端不断拉长然后分裂为两个，见于蕨类和酵母线粒体中。

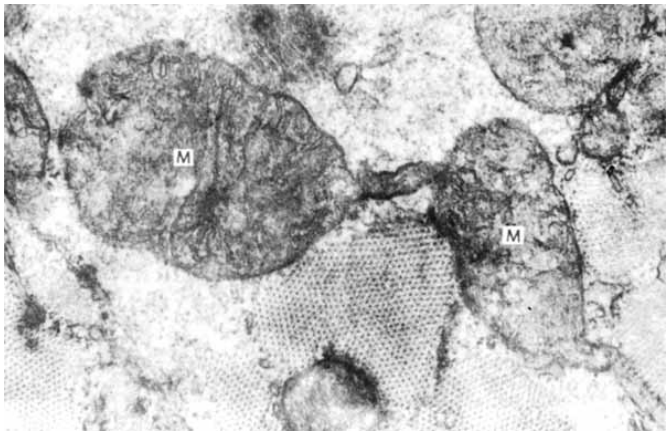


图 7-18 线粒体的收缩分裂

3、出芽，见于酵母和蕨类植物，线粒体出现小芽，脱落后长大，发育为线粒体。

第二节 叶绿体

几乎可以说一切生命活动所需的能量来源于太阳能（光能）。绿色植物是主要的能量转换者是因为它们均含有叶绿体（Chloroplast）这一完成能量转换的细胞器，它能利用光能同化二氧化碳和水，合成糖，同时产生氧（图 7-19）。所以绿色植物的光合作用是地球上有机体生存、繁殖和发展的根本源泉。

$$6CO_2+6H_2O \xrightarrow[\text{叶 绿 体}]{\text{光}} C_6H_{12}O_6+6O_2$$

图 7-19 光合作用反应式

一、形态与结构

在高等植物中叶绿体象双凸或平凸透镜，长径 5~10um，短径 2~4um，厚 2~3um。高等植物的叶肉细胞一般含 50～200 个叶绿体，可占细胞质的 40%，叶绿体的数目因物种细胞类型，生态环境，生理状态而有所不同。

在藻类中叶绿体形状多样，有网状、带状、裂片状和星形等等，而且体积巨大，可达 100um。

叶绿体由叶绿体外被（chloroplast envelope）、类囊体（thylakoid）和基质（stroma）3 部分组成，叶绿体含有 3 种不同的膜：外膜、内膜、类囊体膜和 3 种彼此分开的腔：膜间隙、基质和类囊体腔（图 7-20）。

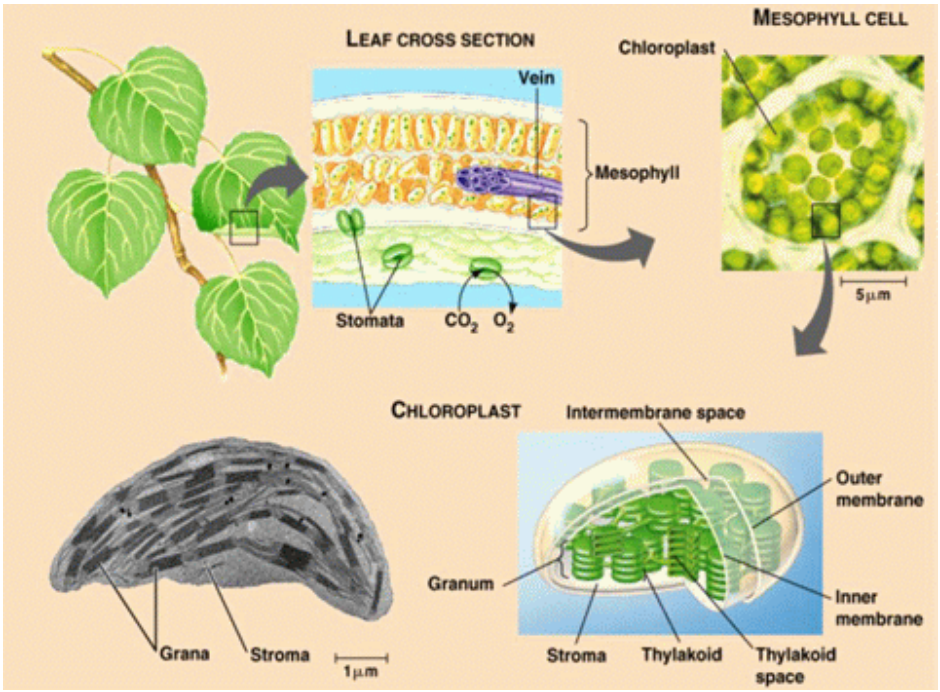


图 7-20 叶绿体的结构

（一）外被

叶绿体外被由双层膜组成，膜间为 10~20nm 的膜间隙。外膜的渗透性大，如核苷、无机磷、蔗糖等许多细胞质中的营养分子可自由进入膜间隙。

内膜对通过物质的选择性很强，CO_2、O_2、Pi、H_2O、磷酸甘油酸、丙糖磷酸，双羧酸和双羧酸氨基酸可以透过内膜，ADP、ATP 已糖磷酸，葡萄糖及果糖等透过内膜较慢。蔗糖、C_5 糖双磷酸酯，C 糖磷酸酯，$NADP^+$及焦磷酸不能透过内膜，需要特殊的转运体（translator）才能通过内膜。

（二）类囊体

是单层膜围成的扁平小囊，沿叶绿体的长轴平行排列。膜上含有光合色素和电子传递链组分，又称光合膜。

许多类囊体象圆盘一样叠在一起，称为基粒，组成基粒的类囊体，叫做基粒类囊体，构成内膜系统的基粒片层（grana lamella）。基粒直径约 0.25~0.8μm，由 10~100 个类囊体组成。每个叶绿体中约有 40~60 个基粒。

贯穿在两个或两个以上基粒之间的没有发生垛叠的类囊体称为基质类囊体，它们形成了内膜系统的基质片层（stroma lamella）。

由于相邻基粒经网管状或扁平状基质类囊体相联结，全部类囊体实质上是一个相互贯通的封闭系统。类囊体做为单独一个封闭膜囊的原始概念已失去原来的意义，它所表示的仅仅是叶绿体切面的平面形态。

类囊体膜的主要成分是蛋白质和脂类（60：40），脂类中的脂肪酸主要是不饱含脂肪酸（约 87%），具有较高的流动性。光能向化学能的转化是在类囊体上进行的，因此类囊体膜亦称光合膜，类囊体膜的内在蛋白主要有细胞色素 b_6/f 复合体、质体醌（PQ）、质体蓝素（PC）、铁氧化还原蛋白、黄素蛋白、光系统 I 、光系统 II 复合物等。

（三）基质

是内膜与类囊体之间的空间，主要成分包括：
碳同化相关的酶类：如 RuBP 羧化酶占基质可溶性蛋白总量的 60%。
叶绿体 DNA、蛋白质合成体系：如，ctDNA、各类 RNA、核糖体等。
一些颗粒成分：如淀粉粒、质体小球和植物铁蛋白等。

二、光合作用机理

光合作用的是能量及物质的转化过程。首先光能转化成电能，经电子传递产生 ATP 和 NADPH 形式的不稳定化学能，最终转化成稳定的化学能储存在糖类化合物中。分为光反应（light reaction）和暗反应（dark reaction），前者需要光，涉及水的光解和光合磷酸化，后者不需要光，涉及 CO2 的固定。分为 C3 和 C4 两类。

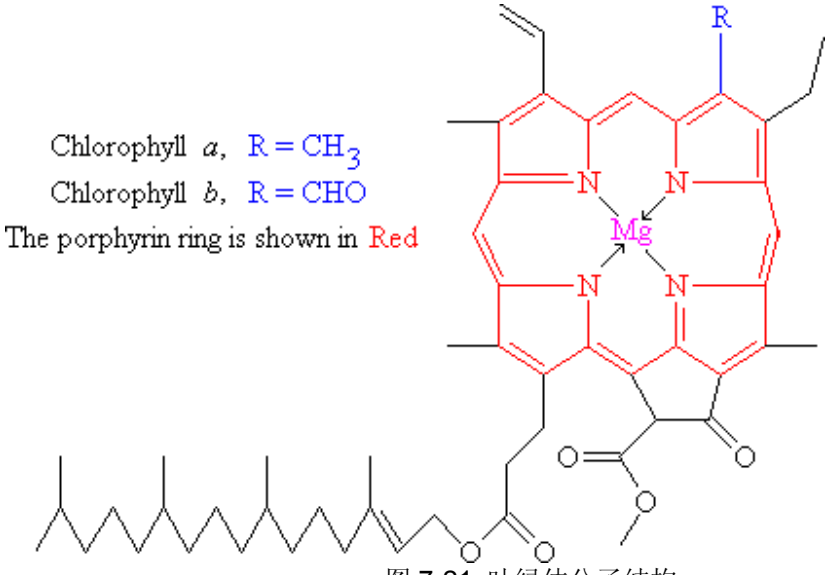


图 7-21 叶绿体分子结构

（一）光合色素和电子传递链组分

1．光合色素

类囊体中含两类色素：叶绿素（图 7-21）和橙黄色的类胡萝卜素，通常叶绿素

和类胡萝卜素的比例约为 3:1，chla 与 chlb 也约为 3:l，全部叶绿素和几乎所有的类胡萝卜素都包埋在类囊体膜中，与蛋白质以非共价键结合，一条肽链上可以结合若干色素分子，各色素分子间的距离和取向固定，有利于能量传递。

2．集光复合体（light harvesting complex）

由大约 200 个叶绿素分子和一些肽链构成（图 7-22）。大部分色素分子起捕获光能的作用，并将光能以诱导共振方式传递到反应中心色素。因此这些色素被称为天线色素。叶绿体中全部叶绿素 b 和大部分叶绿素 a 都是天线色素。另外类胡萝卜素和叶黄素分子也起捕获光能的作用，叫做辅助色素。

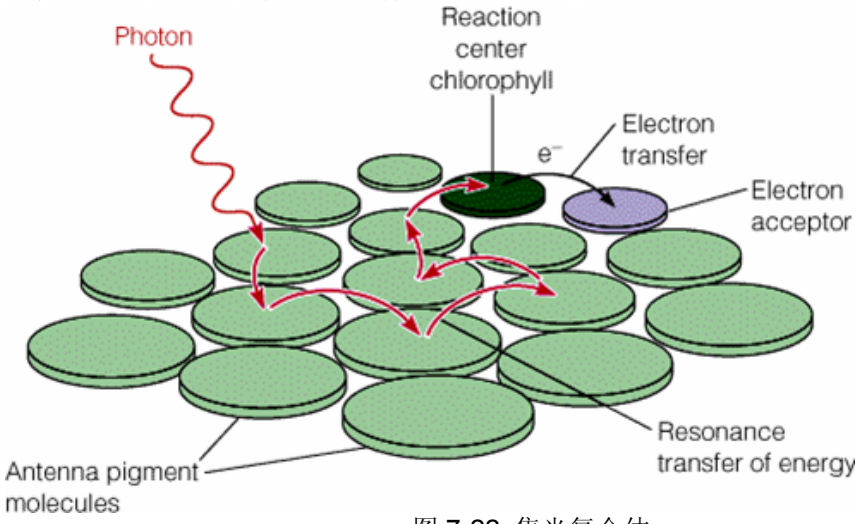


图 7-22 集光复合体

3．光系统 II （PS II ）

吸收高峰为波长 680nm 处，又称 P680。至少包括 12 条多肽链。位于基粒于基质非接触区域的类囊体膜上。包括一个集光复合体（light-hawesting comnplex II，LHC II ）、一个反应中心和一个含锰原子的放氧的复合体（oxygen evolving complex）。D_1 和 D_2 为两条核心肽链，结合中心色素 P680、去镁叶绿素(pheophytin)及质体醌(plastoquinone)。

4．细胞色素 b_6/f 复合体(cyt b_6/f complex)

可能以二聚体形成存在，每个单体含有四个不同的亚基。细胞色素 b_6（b_{563}）、细胞色素 f、铁硫蛋白、以及亚基IV（被认为是质体醌的结合蛋白）。

5．光系统 I （PSI）

能被波长 700nm 的光激发，又称 P700。包含多条肽链，位于基粒与基质接触区和基质类囊体膜中。由集光复合体 I 和作用中心构成。结合 100 个左右叶绿素分子、除了几个特殊的叶绿素为中心色素外外，其它叶绿素都是天线色素。三种电子载体分别为 A_0（一个 chla 分子）、A_1(为维生素 K_1)及 3 个不同的 4Fe-4S。

（二）光反应与电子传递

P680 接受能量后，由基态变为激发态（P680*），然后将电子传递给去镁叶绿素（原初电子受体），P680*带正电荷，从原初电子供体 Z（反应中心 D_1 蛋白上的

一个酪氨酸侧链）得到电子而还原；Z^+再从放氧复合体上获取电子；氧化态的放氧复合体从水中获取电子，使水光解。

$$2H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$$

在另一个方向上去镁叶绿素将电子传给 D_2 上结合的 Q_A，Q_A 又迅速将电子传给 D_1 上的 Q_B，还原型的质体醌从光系统 II 复合体上游离下来，另一个氧化态的质体醌占据其位置形成新的 Q_B。质体醌将电子传给细胞色素 b_6/f 复合体，同时将质子由基质转移到类囊体腔。电子接着传递给位于类囊体腔一侧的含铜蛋白质体蓝素(plastocyanin， PC)中的 Cu^{2+}，再将电子传递到光系统 II 。

P700 被光能激发后释放出来的高能电子沿着 $A_0 \rightarrow A_1 \rightarrow$4Fe-4S 的方向依次传递，由类囊体腔一侧传向类囊体基质一侧的铁氧还蛋白（ferredoxin，FD）。最后在铁氧还蛋白-NADP 还原酶的作用下，将电子传给 $NADP^+$，形成 NADPH。失去电子的 P700 从 PC 处获取电子而还原（图 7-23）。

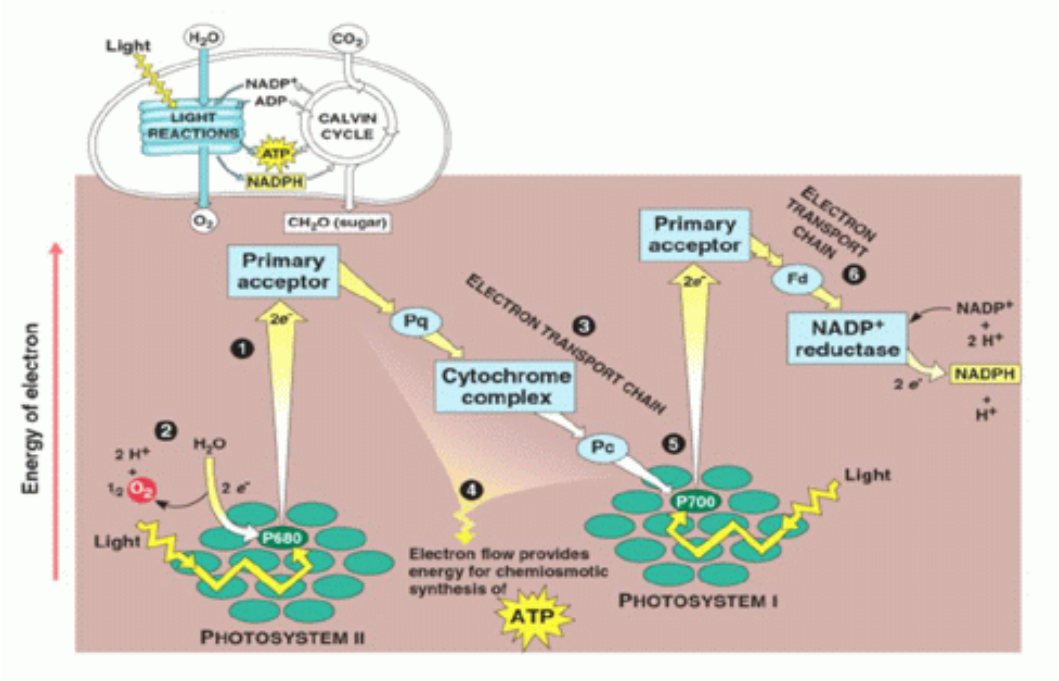


图 7-23 非循环式光合磷酸化

以上电子呈 Z 形传递的过程称为非循环式光合磷酸化（图 7-23），当植物在缺乏 $NADP^+$时，电子在光系统内 I 流动，只合成 ATP，不产生 NADPH，称为循环式光合磷酸化（图 7-24）。

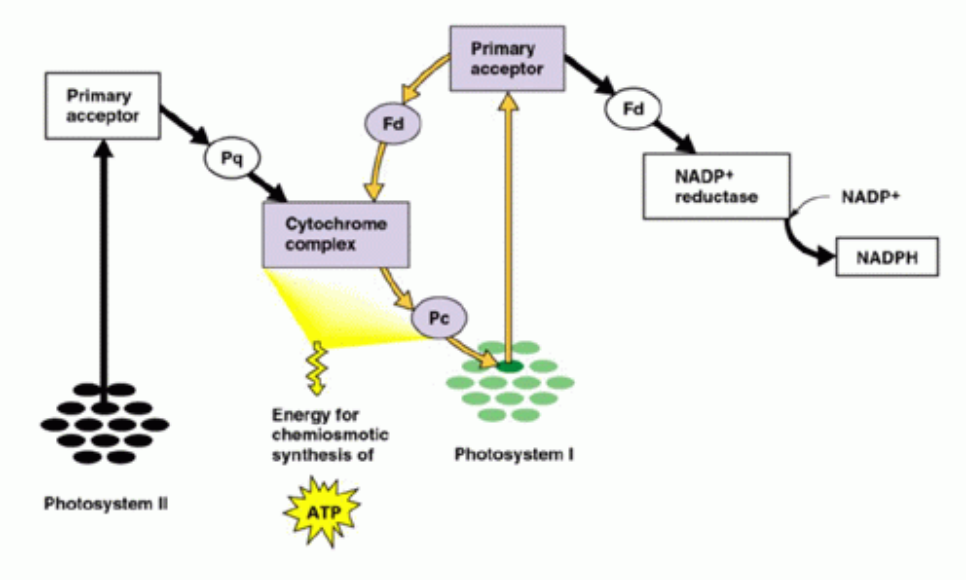


图 7-24 非循环式光合磷酸化

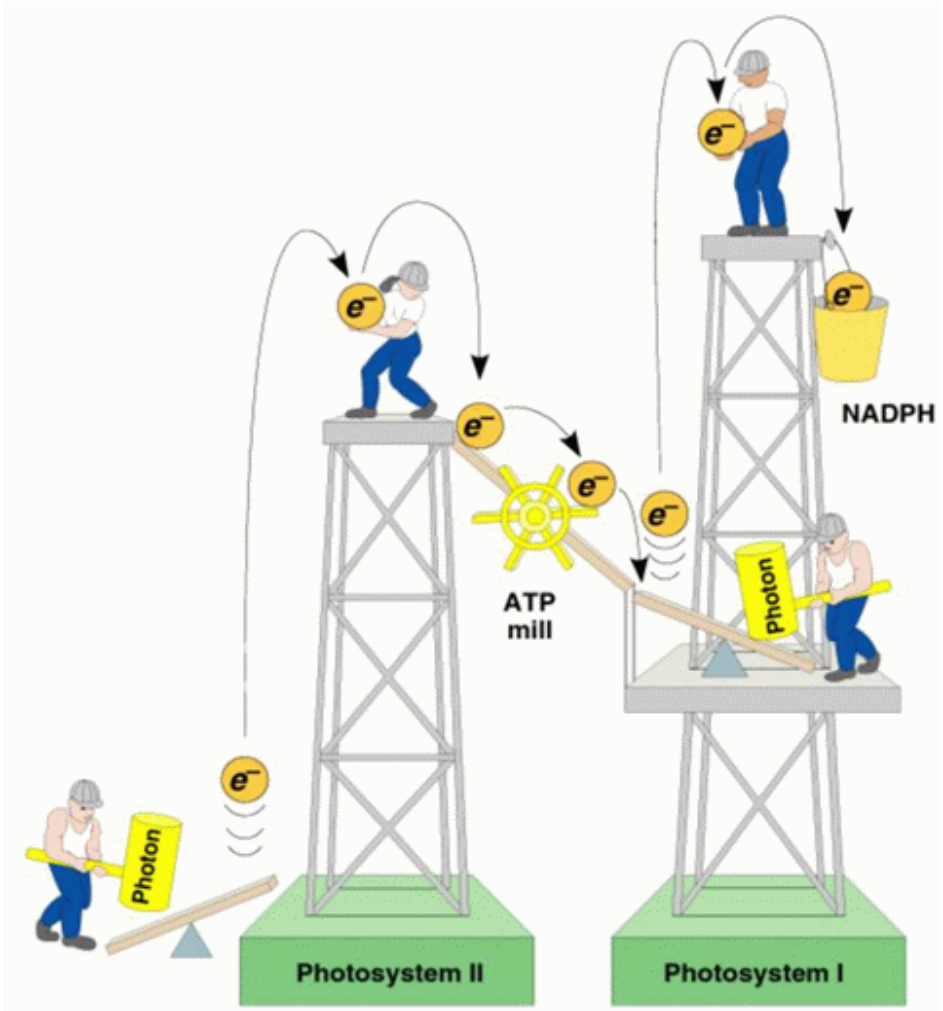


图 7-25 两个光系统的协同作用

（三）光合磷酸化

一对电子从 P680 经 P700 传至 $NADP^+$，在类囊体腔中增加 4 个 H^+，2 个来源于 H_2O 光解，2 个由 PQ 从基质转移而来，在基质外一个 H^+又被用于还原 $NADP^+$，所以类囊体腔内有较高的 H^+（pH≈5，基质 pH≈8），形成质子动力势，H^+经 ATP 合酶，渗入基质、推动 ADP 和 Pi 结合形成 ATP（图 7-26）。

ATP 合酶，即 CF_1-F_0 偶联因子，结构类似于线粒体 ATP 合酶。CF_1 同样由 5 种亚基组成 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ 的结构。CF_0 嵌在膜中，由 4 种亚基构成，是质子通过类囊体膜的通道。

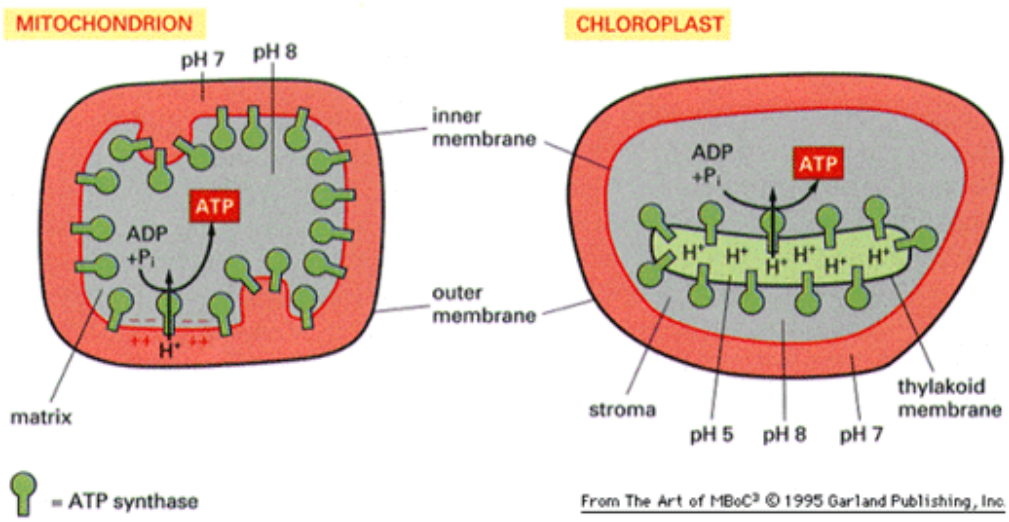


图 7-26 氧化磷酸化和光合磷酸和的比较

（四）暗反应

C3 途径(C3 pathway)：亦称卡尔文 (Calvin)循环。CO_2 受体为 RuBP，最初产物为 3-磷酸甘油酸(PGA)。

C4 途径(C4 pathway) ：亦称哈奇-斯莱克(Hatch-Slack)途径，CO_2 受体为 PEP，最初产物为草酰乙酸(OAA)。

景天科酸代谢途径（Crassulacean acid metabolism pathway，CAM 途径）：夜间固定 CO_2 产生有机酸，白天有机酸脱羧释放 CO_2，进行 CO_2 固定。

三、叶绿体的半自主性

线粒体与叶绿体都是细胞内进行能量转换的场所，两者在结构上具有一定的相似性。①均由两层膜包被而成，且内外膜的性质、结构有显著的差异。②均为半自主性细胞器，具有自身的 DNA 和蛋白质合成体系。因此绿色植物的细胞内存在 3

个遗传系统。

叶绿体 DNA 由 Ris 和 Plaut 1962 最早发现于衣藻叶绿体。

ctDNA 呈环状，长 40~60μm，基因组的大小因植物而异，一般约 200Kb-2500Kb。数目的多少植物的发育阶段有关，如菠菜幼苗叶肉细胞中，每个细胞含有 20 个叶绿体，每个叶绿体含 DNA 分子 200 个，但到接近成熟的叶肉细胞中有叶绿体 150 个，每个叶绿体含 30 个 DNA 分子。

和线粒体一样，叶绿体只能合成自身需要的部分蛋白质，其余的是在细胞质激离的核糖体上合成的，必需运送到叶绿体，才能发挥叶绿体应有的功能。已知由 ctDNA 编码的 RNA 和多肽有：叶绿体核糖体中 4 种 rRNA（20S、16S、4.5S 及 5S），20 种（烟草）或 31 种（地钱）tRNA，约 90 多种多肽。

由于叶绿体在形态、结构、化学组成、遗传体系等方面与蓝细菌相似，人们推测叶绿体可能也起源于内共生的方式，是寄生在细胞内的蓝藻演化而来的。

四、叶绿体的增殖

在个体发育中叶绿体由原质体发育而来，原质体存在于根和芽的分生组织中，由双层被膜包围，含有 DNA，一些小泡和淀粉颗粒的结构，但不含片层结构，小泡是由质体双层膜的内膜内折形成的。

在有光条件原质体的小泡数目增加并相互融合形成片层，多个片层平行排列成行，在某些区域增殖，形成基粒，变成绿色原质体发育成叶绿体。

在黑暗性长时，原质体小泡融合速度减慢，并转变为排列成网格的小管的三维晶格结构，称为原片层，这种质体称为黄色体。黄色体在有光的情况下原片层弥散形成类囊体，进一步发育出基粒，变为叶绿体。

叶绿体能靠分裂而增殖，这各分裂是靠中部缢缩而实现的，在发育 7 天的 幼叶的基部 2-2.5cm 处很容易看到幼龄叶绿体呈哑铃形状，从菠菜幼叶含叶绿体少，ctDNA 多，老叶含叶绿体多，每个叶绿体含 ctDNA 少的现象也可以看出叶绿体是以分裂的方式增殖的。

成熟叶绿体正常情况下一般不再分裂或很少分裂。

第三节 线粒体与叶绿体的蛋白质定向转运

一、线粒体蛋白质的转运

线粒体的蛋白合成能力有限，大量线粒体蛋白在细胞质中合成，定向转运到线粒体。这些蛋白质在在运输以前，以未折叠的前体形式存在，与之结合的分子伴娘（属 hsp70 家族）保持前体蛋白质处于非折叠状态。通常前体蛋白 N 端有一段信号序列称为导肽、前导肽或转运肽（leader sequence、presequence 或 transit-peptide），完成转运后被信号肽酶（signal peptidase）切除，就成为成熟蛋

白，这种现象就叫做后转译（posttranslation，图 7-27）。

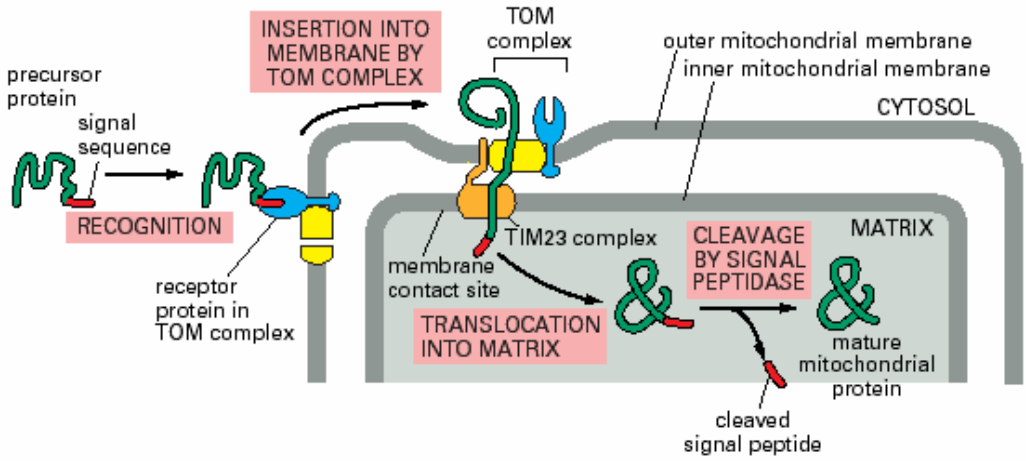
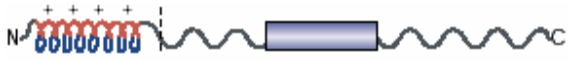
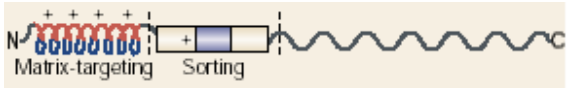


图 7-27 线粒体蛋白质的定向转运 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

线粒体前体蛋白信号序列的特点是：①多位于肽链的 N 端，由大约 20 个氨基酸构成；②没有带负电荷的氨基酸，形成一个两性 α 螺旋，带正电荷的氨基酸残基和不带电荷的疏水氨基酸残基分别位于螺旋的两侧，现在认为这个螺旋与转位因子的识别有关；③对所牵引的蛋白质没有特异性要求，非线粒体蛋白连接上此类信号序列，也会被转运到线粒体。此外有些信号序列位于蛋白质内部，完成转运后不被切除，还有些信号序列位于前体蛋白 C 端，如线粒体的 DNA 解旋酶 Hmil。

表7-1 线粒体蛋白分选信号*

信号序列	定位	转运装置	信号序列位置
位于 N 端，富含带正电荷的和疏水的氨基酸，形成两性 α 螺旋，完成转运后被切除。	基质	TOM TIM23	
不被切除，含疏水性的停止转移序列，被安插到外膜。	外膜	TOM	
被切除，含疏水性的停止转移序列，被安插到内膜。	内膜	TOM TIM23	
含两个信号序列，首先转运到基质，第一个信号序列被切除，第二个信号序列引导蛋白进入内膜或膜间隙。	内膜 膜间隙	TOM TIM23	
结构类似于 N 端信号序列，但位于蛋白质内部。	内膜	TOM TIM23	
为线粒体代谢物的转运蛋白，如腺苷转位酶，具有多个内部信号序列和停止转移序列，形成多次跨膜蛋白。	内膜	TOM TIM22	

*根据 N. Pfanner and A. Geissler 2001 改编

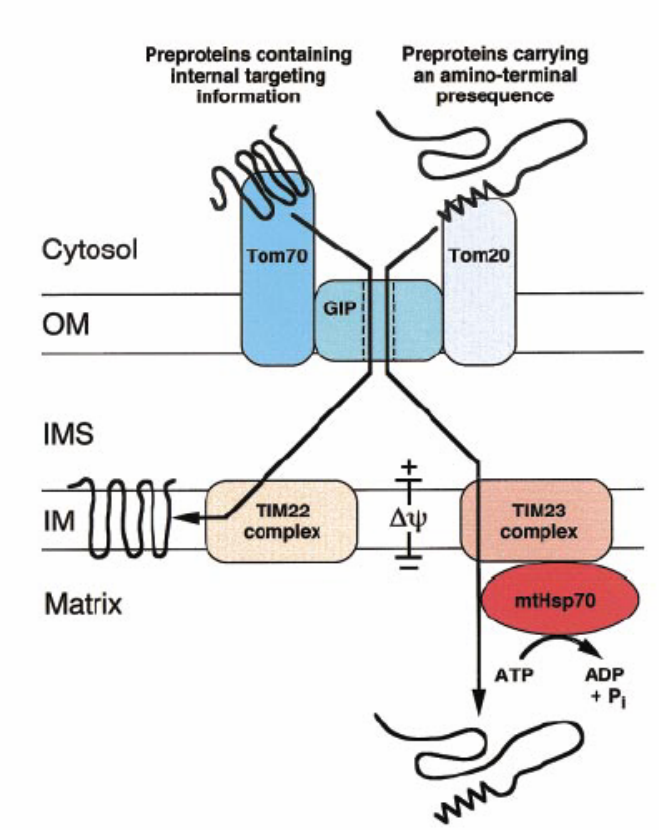


图7-28 线粒体的蛋白转运装置——TOM和TIM复合体 引自**Joachim Rassow and Nikolaus Pfanner** 2000

蛋白质的转运涉及多种蛋白复合体，即转位因子（translocator，图7-28），由两部分构成的：受体和蛋白质通过的孔道。主要包括：①TOM复合体，负责通过外膜，进入膜间隙，在酵母中TOM70负责转运内部具有信号序列的蛋白，TOM20负责转运N端具有信号序列的蛋白，这两种蛋白的功能都相当于内质网上的SPR受体，在人类线粒体中hTom34的功能与TOM70相当。TOM复合体的通道被称为GIP（general import pore），就相当于内质网上的SEC61复合体，主要由Tom40构成，还包括Tom22， Tom7， Tom6和Tom5；②TIM复合体，其中TIM23负责将蛋白质转运到基质，也可将某些蛋白质安插在内膜；TIM22负责将线粒体的代谢物运输蛋白，如ADP／ATP和磷酸的转运蛋白插入内膜；③OXA复合体：负责将线粒体自身合成的蛋白质插到内膜上，同样也可使经由TOM／TIM复合体进入基质的蛋白质插入内膜。

线粒体具有四个功能区隔，即外膜、内膜、膜间隙、基质。进入不同部位的蛋白具有不同的转运途径。

进入外膜的蛋白具有不被切除的 N 端信号序列，其后还有疏水性序列作为停止转移序列，然后蛋白质被 TOM 复合体安装到外膜上，如线粒体的各类孔蛋白。

进入基质蛋白质可以先通过 TOM 复合体进入膜间隙，然后通过 TIM 复合体进入基质。也可以通过线粒体内、外膜间的接触点（鼠肝直径 1um 线粒体上约 115 个接触点），一步进入基质，在接触点上 TOM 与 TIM 协同作用完成蛋白质向基质的输入（图 7-29）。

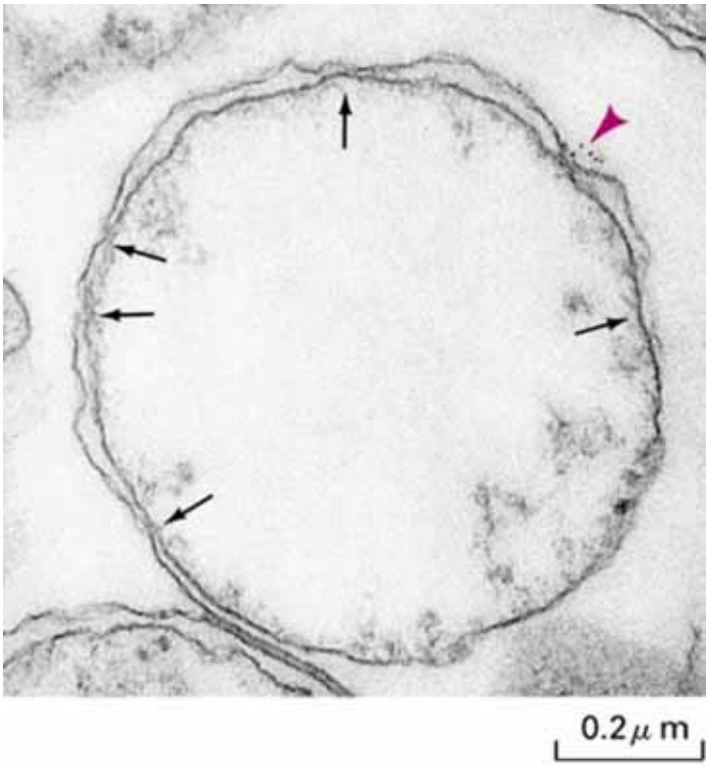


图 7-29 线粒体内外膜的接触点

进入线粒体内膜和膜间隙的蛋白具有以下几种情况（图 7-30）：①蛋白 N 端具有两个信序列，首先被运送到基质，然后 N 端信号肽被切除，暴露出导向内膜的信号序列，在 OXA 的帮助下插入内膜。如果第二段信号序列被内膜外表面的异二聚体内膜蛋白酶（heterodimeric inner membrane peptidase，Imp1/imp2）切除，则成为膜间隙蛋白。②N 端信号序列的后面有一段疏水序列，扮演停止转移序列的角色，能与 TIM23 复合体结合，当进入基质的信号序列被切除后，脱离转位因子复合体而进入内膜，如果插入膜中的部分又被酶切除，侧成为定位于膜间隙的蛋白。③线粒体内膜上负责代谢底物 / 产物转运的蛋白，如腺苷转位酶是多次跨膜蛋白，其 N 端没有可被切除的信号序列，但包含 3－6 个内部信号序列，可被 TIM22 复合体插到内膜上。

蛋白质的输入是一个耗能的过程，能量的来源为水解 ATP 和利用质子动力势．能量消耗在线粒体外和进入线粒体基质两步上，在线粒体外解除与前体蛋白质结合的分子伴娘，需要通过水解 ATP 获得能量；在通过 TIM 复合体进入基质时利用质子动力势作为动力。虽然目前含不清楚质子动力势是如何被利用的，但解偶连接如 DNP 能抑制蛋白质的转运。前体蛋白进入线粒体基质后，线粒体 hsp70 一个接一个的结合在蛋白质线性分子上，像齿轮一样将蛋白质“铰进（hand over hand）”基质，这一过程也需要消耗 ATP。然后线粒体 hsp70 将蛋白质交给 hsp60，完成折叠。

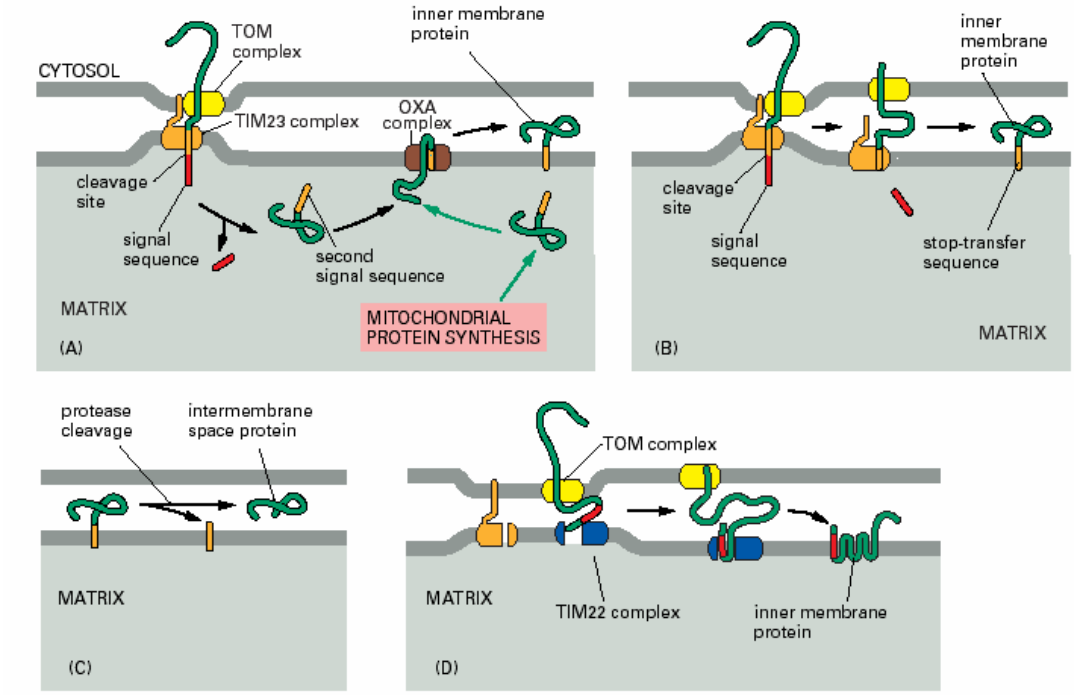


图 7-30 蛋白质进入内膜和膜间隙 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002，（A. 进入内膜和膜间隙的前体蛋白具有两个信号序列，经 TOM / TIM23 进入基质后，第二个信号序列使蛋白通过 OXA 复合体被安插到内膜上；B. 进入内膜和膜间隙的前体蛋白信号序列后具有停止转移序列，被 TIM23 安插在膜上，C. 通过途径 A、B 插入内膜的蛋白，被位于内膜的蛋白酶加工，成为膜间隙的可溶性蛋白，D. 线粒体代谢物的转运器为多次跨膜蛋白，被 TIM22 安插到内膜中）

二、叶绿体的蛋白质转运

叶绿体大约含2000-2500 种蛋白，叶绿体基因组编码的不足100 种，因此大量的蛋白质也是由核基因编码，在细胞质中合成，然后定向转运到叶绿体。

叶绿体蛋白的转运机理与线粒体的相似。如：通常前体蛋白 N 端具有信号序列，完成转运后被信号肽酶切除，和线粒体一样发生后转译；每一种膜上有特定的转位因子；内外膜具有接触点（contact site）；需要能量，同样利用 ATP 和质子动力势。但是两者的蛋白质转运体系中除了某些 hsp 分子相同外，转位因子复合体是不同的。叶绿体外膜的转位因子被称为 TOC 复合体，内膜的转位因子被称为 TIC 复合体。

叶绿体有 6 个区隔：①外膜、②膜间隙、③内膜、④基质、⑤类囊体膜、⑥类囊体腔。因此叶绿体的蛋白转运途径更复杂一些。

叶绿体前体蛋白的 N 端信号序列长度为 20－150 个氨基酸残基，同一植物不同前体蛋白的 N 端序列不具有同源性，分为 3 个部分：N 端缺乏带正电荷的氨基酸，以及甘氨酸和脯氨酸；C 端形成两性 β 折叠；中间富含羟基化的氨基酸，如丝氨酸和苏氨酸。

转运到叶基质的前体蛋白具有典型的 N 端序列。转运到叶绿体内膜和类囊体的

前体蛋白含有两个 N 端信号序列，第一个被切除后，暴露出第二个信号序列，将蛋白导向内膜或类囊体膜（图 7-30）。转运到叶绿体外膜上的蛋白分两类：一类含内部信号序列；另一类蛋白的 N 端序列被切除后，其后的停止转移序列使蛋白质定位在外膜。

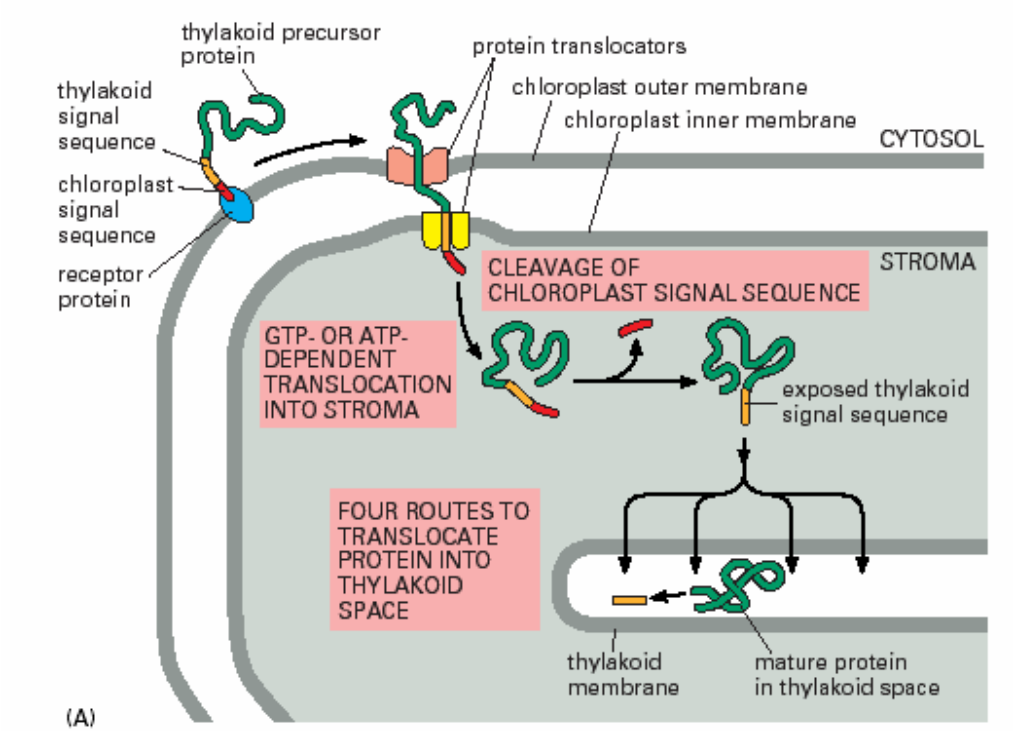


图 7-31 叶绿体的蛋白质定向转运 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

第八章　细胞通信

生命与非生命物质最显著的区别在于生命是一个完整的自然的信息处理系统。一方面生物信息系统的存在使有机体得以适应其内外部环境的变化，维持个体的生存；另一方面信息物质如核酸和蛋白质信息在不同世代间传递维持了种族的延续。生命现象是信息在同一或不同时空传递的现象，生命的进化实质上就是信息系统的进化。

单细胞生物通过反馈调节，适应环境的变化。多细胞生物则是由各种细胞组成的细胞社会，除了反馈调节外，更有赖于细胞间的通讯与信号传导，以协调不同细胞的行为，如：①调节代谢，通过对代谢相关酶活性的调节，控制细胞的物质和能量代谢；②实现细胞功能，如肌肉的收缩和舒张，腺体分泌物的释放；③调节细胞周期，使 DNA 复制相关的基因表达，细胞进入分裂和增殖阶段；④控制细胞分化，使基因有选择性地表达，细胞不可逆地分化为有特定功能的成熟细胞；⑤影响细胞的存活(图 8-1)。

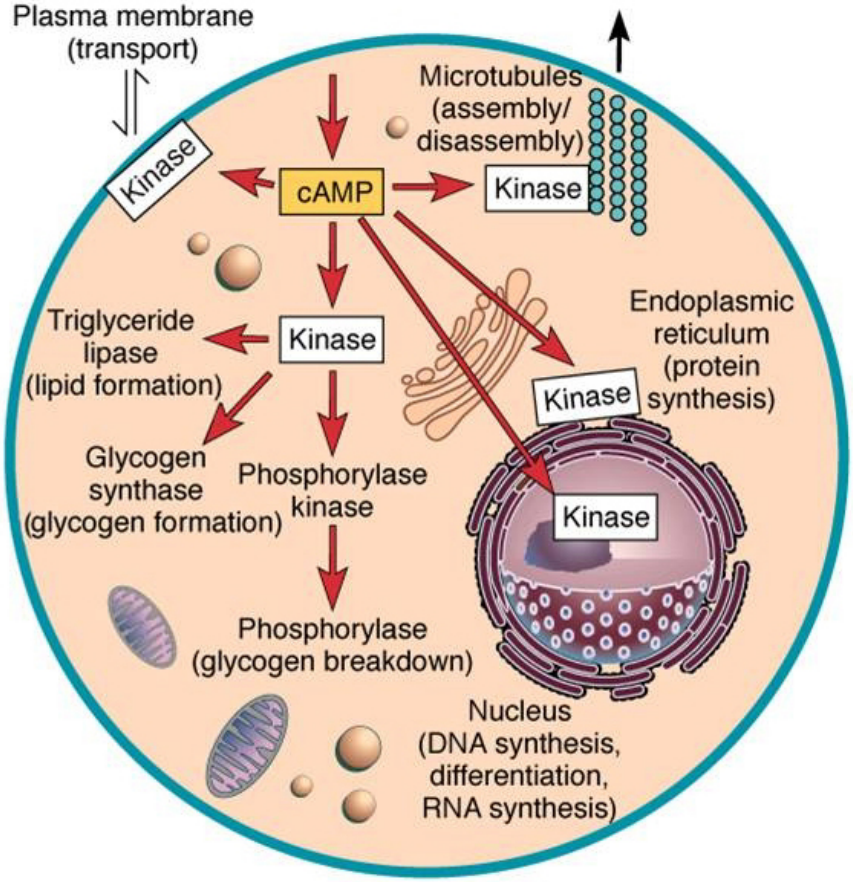


图 8-1 细胞通信的作用

第一节　基本概念

一、几个容易混淆的概念

近年来，由于细胞通信在医学尤其是揭示癌症方面的重要性，使这一领域的研究十分活跃，文献和著作非常的多，不同的作者往往使用不同的名词来描述细胞的信息传递现象，虽然这些名词很相近，但是其内涵和外延不尽相同，现解释如下：

细胞信号发放（cell signaling）[12]，细胞释放信号分子，将信息传递给其它细胞。

细胞通讯（cell communication）[13]指一个细胞发出的信息通过介质传递到另一个细胞产生相应反应的过程。

细胞识别（cell recognition）[14]指细胞与细胞之间通过细胞表面的信息分子相互作用，从而引起细胞反应的现象

信号转导（signal transduction）[15] 指外界信号（如光、电、化学分子）与细胞细胞表面受体作用，通过影响细胞内信使的水平变化，进而引起细胞应答反应的一系列过程。

二、细胞信号分子

生物细胞所接受的信号既可以使物理信号（光、热、电流），也可以是化学信号，但是在有机体间和细胞间的通讯中最广泛的信号是化学信号。

从化学结构来看细胞信号分子包括：短肽、蛋白质、气体分子（NO、CO）以及氨基酸、核苷酸、脂类和胆固醇衍生物等等，其共同特点是：①特异性，只能与特定的受体结合；②高效性，几个分子即可发生明显的生物学效应，这一特性有赖于细胞的信号逐级放大系统；③可被灭活，完成信息传递后可被降解或修饰而失去活性，保证信息传递的完整性和细胞免于疲劳。

从产生和作用方式来看可分为内分泌激素、神经递质、局部化学介导因子和气体分子等四类。

从溶解性来看又可分为脂溶性和水溶性两类。脂溶性信号分子，如甾类激素和甲状腺素，可直接穿膜进入靶细胞，与胞内受体结合形成激素-受体复合物，调节基

[12] Release by one cell of substances that transmit information to other cells.

[13] Any of several ways in which living cells of an organism communicate with one another, whether by direct contact between cells or by means of chemical signals carried by neurotransmitter substances, hormones, and cyclic amp.

[14] Interaction between cells that is possibly dependent upon specific adhesion. Since the mechanism is not entirely clear in most cases, the term should be used with caution.

[15] The cascade of processes by which an extracellular signal (typically a hormone or neurotransmitter) interacts with a receptor at the cell surface causing a change in the level of a second messenger (for example calcium or cyclic AMP) and ultimately effects a change in the cell's functioning (for example, triggering glucose uptake, or initiating cell division). Can also be applied to sensory signal transduction, eg. of light at photoreceptors.

因表达。水溶性信号分子，如神经递质、细胞因子和水溶性激素，不能穿过靶细胞膜，只能与膜受体结合，经信号转换机制，通过胞内信使（如 cAMP）或激活膜受体的激酶活性（如受体酪氨酸激酶），引起细胞的应答反应。所以这类信号分子又称为第一信使（primary messenger），而 cAMP 这样的胞内信号分子被称为第二信使（secondary messenger）。目前公认的第二信使有 cAMP、cGMP、三磷酸肌醇（IP3）和二酰基甘油（DG），Ca^{2+}被称为第三信使是因为其释放有赖于第二信使。第二信使的作用是对胞外信号起转换和放大的作用。

三、受体

受体（receptor）是一种能够识别和选择性结合某种配体（信号分子）的大分子物质，多为糖蛋白，一般至少包括两个功能区域，与配体结合的区域和产生效应的区域，当受体与配体结合后，构象改变而产生活性，启动一系列过程，最终表现为生物学效应。受体与配体间的作用具有三个主要特征：①特异性；②饱和性；③高度的亲和力。

根据靶细胞上受体存在的部位，可将受体分为细胞内受体（intracellular receptor）和细胞表面受体（cell surface receptor，图 8-2）。细胞内受体介导亲脂性信号分子的信息传递，如胞内的甾体类激素受体。细胞表面受体介导亲水性信号分子的信息传递，可分为：①离子通道型受体、②G 蛋白耦联型受体和③酶耦联型受体。

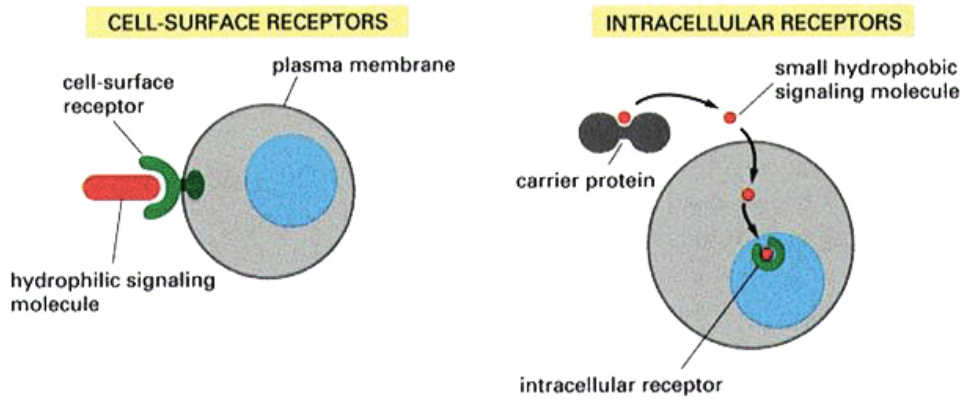


图 8-2 细胞表面受体和细胞内受体

每一种细胞都有其独特的受体和信号转导系统，细胞对信号的反应不仅取决于其受体的特异性，而且与细胞的固有特征有关。有时相同的信号可产生不同的效应，如 Ach 可引起骨骼肌收缩、降低心肌收缩频率，引起唾腺细胞分泌。有时不同信号产生相同的效应，如肾上腺素、胰高血糖素，都能促进肝糖原降解而升高血糖。

细胞持续处于信号分子刺激下的时候，细胞通过多种途径使受体钝化，产生适应。如：

①修饰或改变受体，如磷酸化，使受体与下游蛋白隔离，即**受体失活**(receptor inactivation)。

②暂时将受体移到细胞内部，即**受体隐蔽**（receptor sequestration）
③通过内吞作用，将受体转移到溶酶体中降解，即**受体下行调节**（receptor down-regulation）

四、蛋白激酶

蛋白激酶是一类磷酸转移酶，其作用是将 ATP 的 γ 磷酸基转移到底物特定的氨基酸残基上，使蛋白质磷酸化，可分为 5 类（表 8-1）。蛋白激酶在信号转导中主要作用有两个方面：其一是通过磷酸化调节蛋白质的活性，磷酸化和去磷酸化是绝大多数信号通路组分可逆激活的共同机制，有些蛋白质在磷酸化后具有活性，有些则在去磷酸化后具有活性；其二是通过蛋白质的逐级磷酸化，使信号逐级放大，引起细胞反应。

表 8-1 蛋白激酶的种类

激酶	磷酸基团受体
蛋白丝氨酸 / 苏氨酸激酶	丝氨酸 / 苏氨酸羟基
蛋白酪氨酸激酶	酪氨酸的酚羟基
蛋白组 / 赖 / 精氨酸激酶	咪唑环，胍基，ε－氨基
蛋白半胱氨酸激酶	巯基
蛋白天冬氨酸 / 谷氨酸激酶	酰基

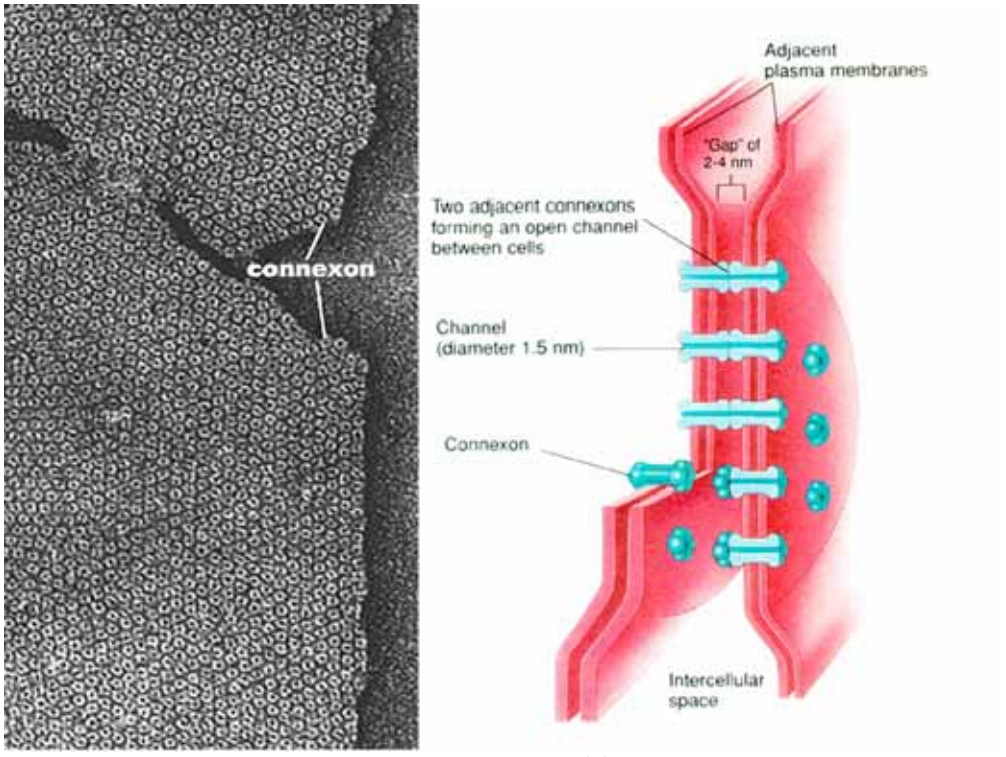


图 8-3 细胞间隙连接

五、胞间通信的主要类型

细胞通讯主要有以下三种方式。

（一）细胞间隙连接（gap junction）

是细胞间的直接通讯方式（图 8-3）。两个相邻的细胞以连接子（connexon）相联系。连接子中央为直径 1.5nm 的亲水性孔道。允许小分子物质如 Ca^{2+}、cAMP 通过，有助于相邻同型细胞对外界信号的协同反应，如可兴奋细胞的电耦联现象。

（二）膜表面分子接触通讯

是指细胞通过其表面信号分子（受体）与另一细胞表面的信号分子（配体）选择性地相互作用，最终产生细胞应答的过程，即细胞识别（cell recognition，图 8-4）。可分为：①同种同类细胞间的识别，如胚胎分化过程中神经细胞对周围细胞的识别，输血和植皮引起的反应可以看作同种同类不同来源细胞间的识别；②同种异类细胞间的识别，如精子和卵子之间的识别，T 与 B 淋巴细胞间的识别；③异种异类细胞间的识别，如病原体对宿主细胞的识别，④异种同类细胞间的识别，仅见于实验条件下。

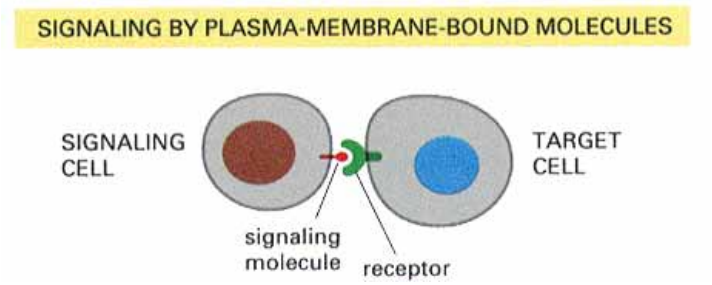


图 8-4 膜表面分子接触通讯

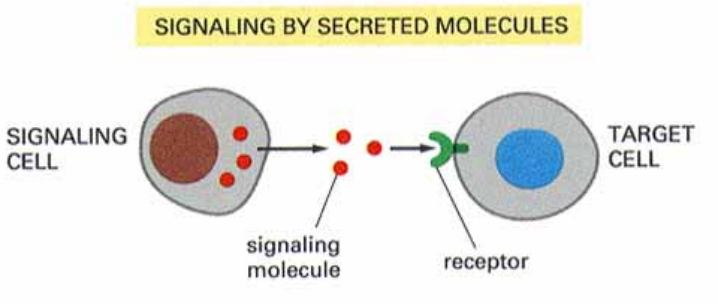


图 8-5 化学通讯

（三）化学通讯

化学通讯是间接的细胞通讯（图 8-5），指细胞分泌一些化学物质（如激素）至细胞外，作为信号分子作用于靶细胞，调节其功能。根据化学信号分子可以作用的距离范围，可分为以下 4 类（图 8-6）：

1. 内分泌（endocrine）：内分泌细胞分泌的激素随血液循环输至全身，作用于靶细胞。其特点是：①低浓度，仅为 10^{-8}-10^{-12}M；②全身性，随血液流经全身，但只能与特定的受体结合而发挥作用；③长时效，激素产生后经过漫长的运送过程才起作用，而且血流中微量的激素就足以维持长久的作用。
2. 旁分泌（paracrine）：细胞分泌的信号分子通过扩散作用于邻近的细胞。包括：①各类细胞因子（如表皮生长因子）；②气体信号分子（如：NO）
3. 突触信号发放：神经递质（如乙酰胆碱）由突触前膜释放，经突触间隙扩散到突触后膜，作用于特定的靶细胞。
4. 自分泌（autocrine）：与上述三类不同的是，信号发放细胞和靶细胞为同类或同一细胞，常见于癌变细胞。如：大肠癌细胞可自分泌产生胃泌素，介导调节 c-myc、c-fos 和 ras p21 等癌基因表达，从而促进癌细胞的增殖。

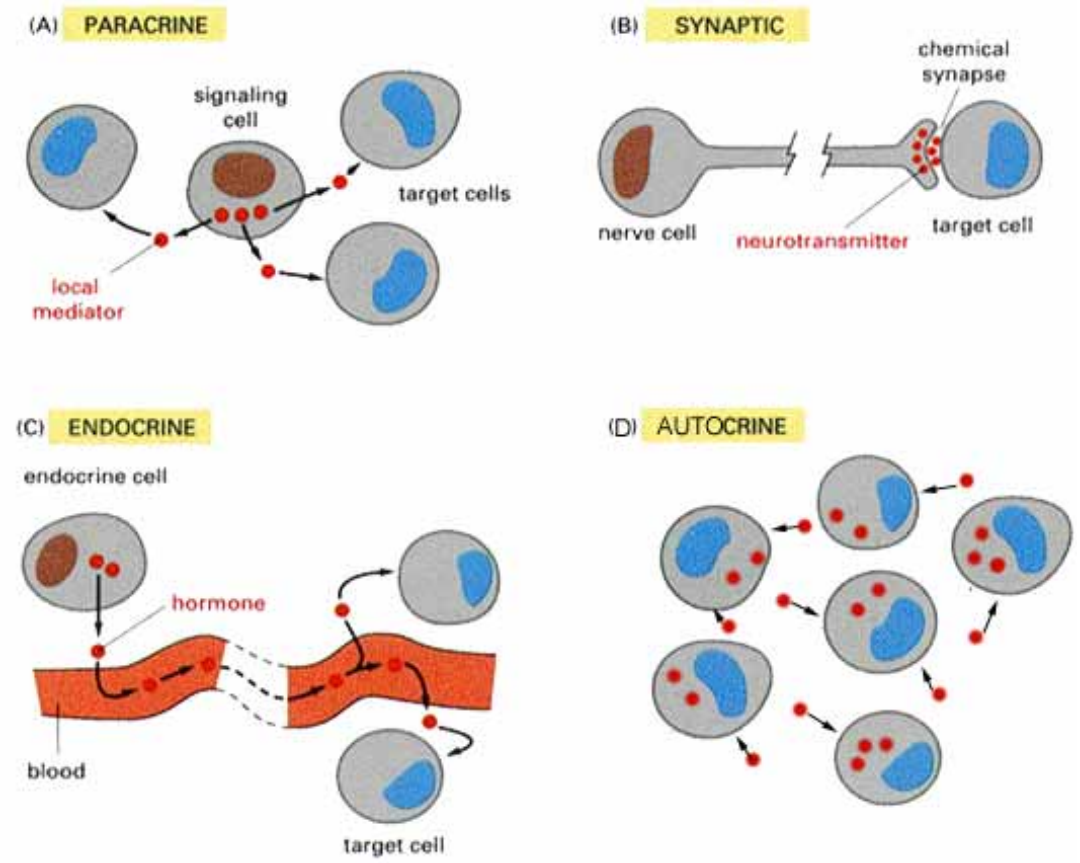


图 8-6 化学通信的类型

第二节　膜表面受体介导的信号转导

亲水性化学信号分子（包括神经递质、蛋白激素、生长因子等）不能直接进入细胞，只能通过膜表面的特异受体传递信号，使靶细胞产生效应。

膜表面受体主要有三类（图 8-7）：①离子通道型受体（ion-channel-linked receptor）；②G 蛋白耦联型受体（G-protein-linked receptor）；③酶耦联的受体（enzyme-linked receptor）。第一类存在于可兴奋细胞。后两类存在于大多数细胞，在信号转导的早期表现为激酶级联（kinase cascade）事件，即为一系列蛋白质的逐级磷酸化，籍此使信号逐级传送和放大。

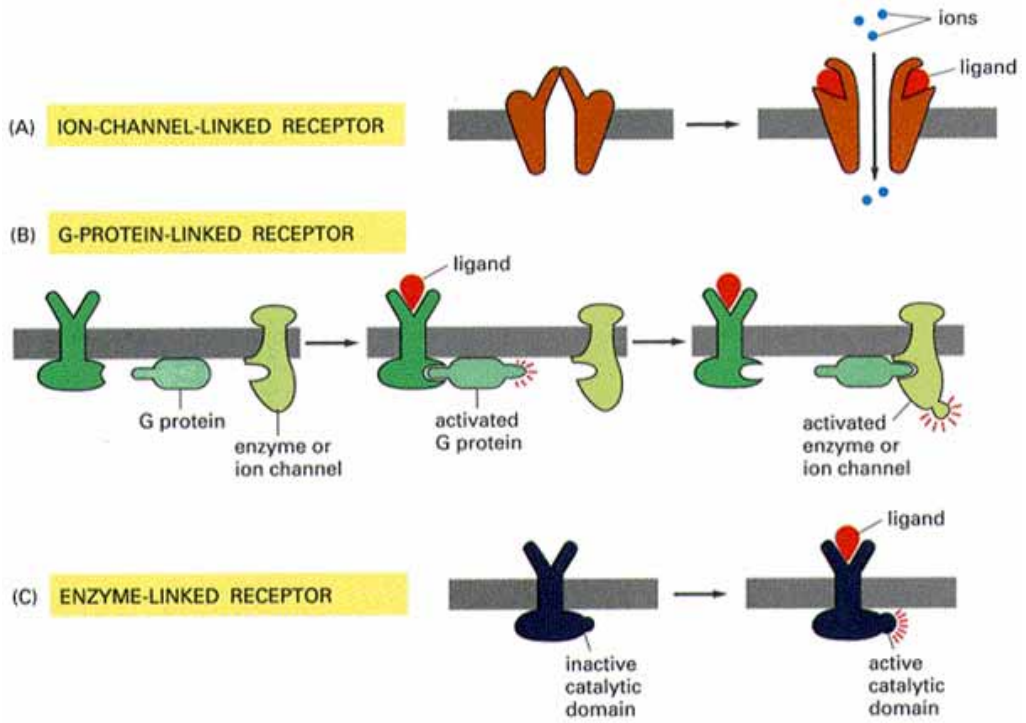


图 8-7 膜表面受体主要有三类

一、离子通道型受体

离子通道型受体（图 8-8）是一类自身为离子通道的受体，即配体门通道（ligand-gated channel）。主要存在于神经、肌肉等可兴奋细胞，其信号分子为神经递质。

神经递质通过与受体的结合而改变通道蛋白的构象，导致离子通道的开启或关闭，改变质膜的离子通透性，在瞬间将胞外化学信号转换为电信号，继而改变突触后细胞的兴奋性。如：乙酰胆碱受体（图 8-9、10）以三种构象存在，两分子乙酰胆碱的结合可以使之处于通道开放构象，但该受体处于通道开放构象状态的时限仍十分短暂，在几十毫微秒内又回到关闭状态。然后乙酰胆碱与之解离，受体则恢复

到初始状态，做好重新接受配体的准备。

离子通道型受体分为阳离子通道，如乙酰胆碱、谷氨酸和五羟色胺的受体，和阴离子通道，如甘氨酸和γ－氨基丁酸的受体。

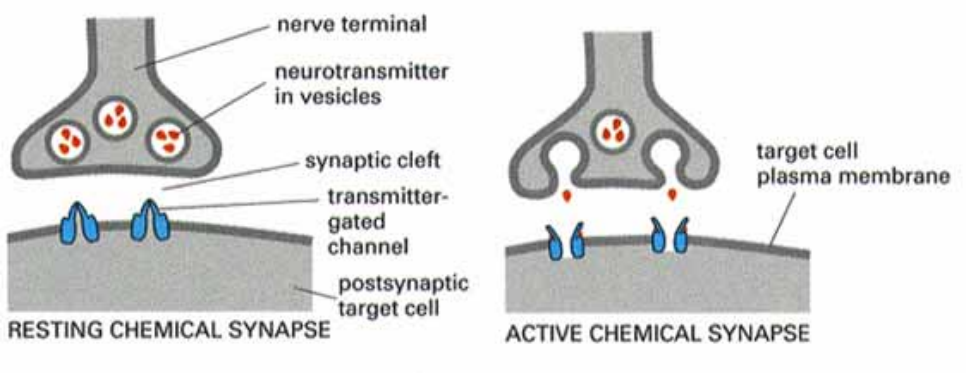


图8-8 离子通道型受体

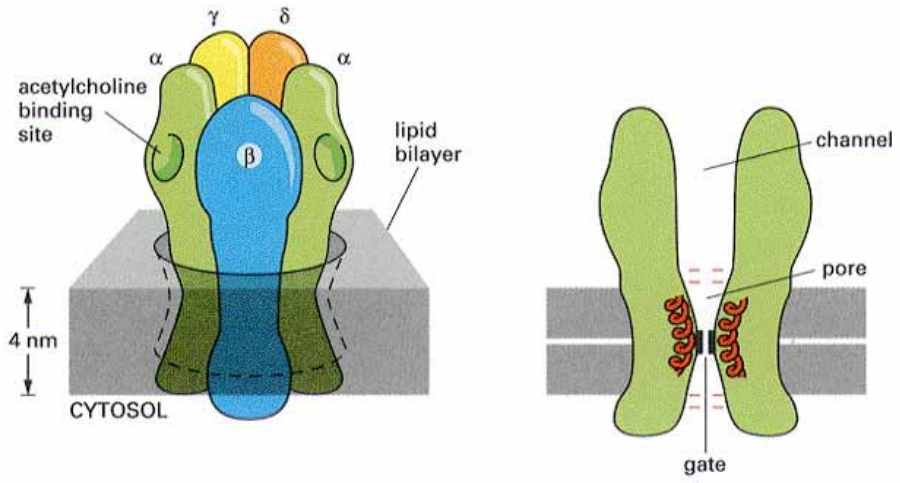


图8-9 乙酰胆碱受体结构模型

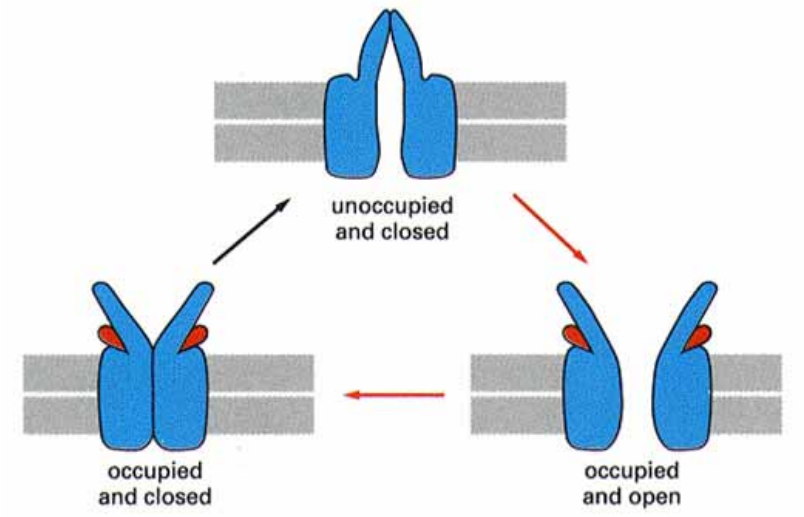


图8-10 乙酰胆碱受体的三种构象

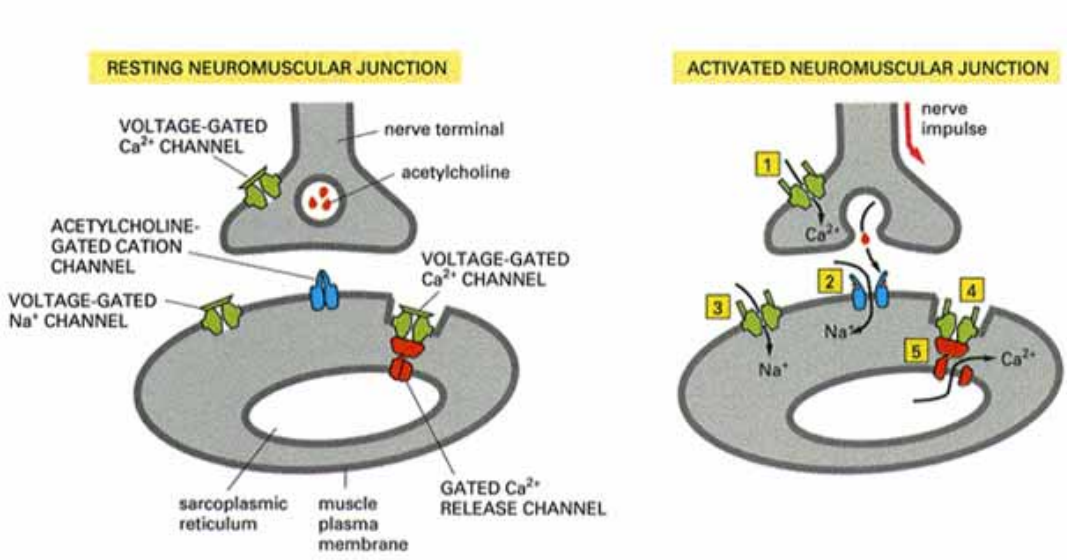


图8-11 神经肌肉接点处的离子通道型受体

二、G 蛋白耦联型受体

三聚体 GTP 结合调节蛋白（trimeric GTP-binding regulatory protein）简称 G 蛋白，位于质膜胞质侧，由 α、β、γ 三个亚基组成，α 和 γ 亚基通过共价结合的脂肪酸链尾结合在膜上，G 蛋白在信号转导过程中起着分子开关的作用（图 8-12），当 α 亚基与 GDP 结合时处于关闭状态，与 GTP 结合时处于开启状态，α 亚基具有 GTP 酶活性，能催化所结合的 ATP 水解，恢复无活性的三聚体状态，其 GTP 酶的活性能被 RGS（regulator of G protein signaling）增强。RGS 也属于 GAP（GTPase activating protein）。

G 蛋白耦联型受体为 7 次跨膜蛋白（图 8-13），受体胞外结构域识别胞外信号分子并与之结合，胞内结构域与 G 蛋白耦联。通过与 G 蛋白耦联，调节相关酶活性，在细胞内产生第二信使，从而将胞外信号跨膜传递到胞内。G 蛋白耦联型受体包括多种神经递质、肽类激素和趋化因子的受体，在味觉、视觉和嗅觉中接受外源理化因素的受体亦属 G 蛋白耦联型受体。

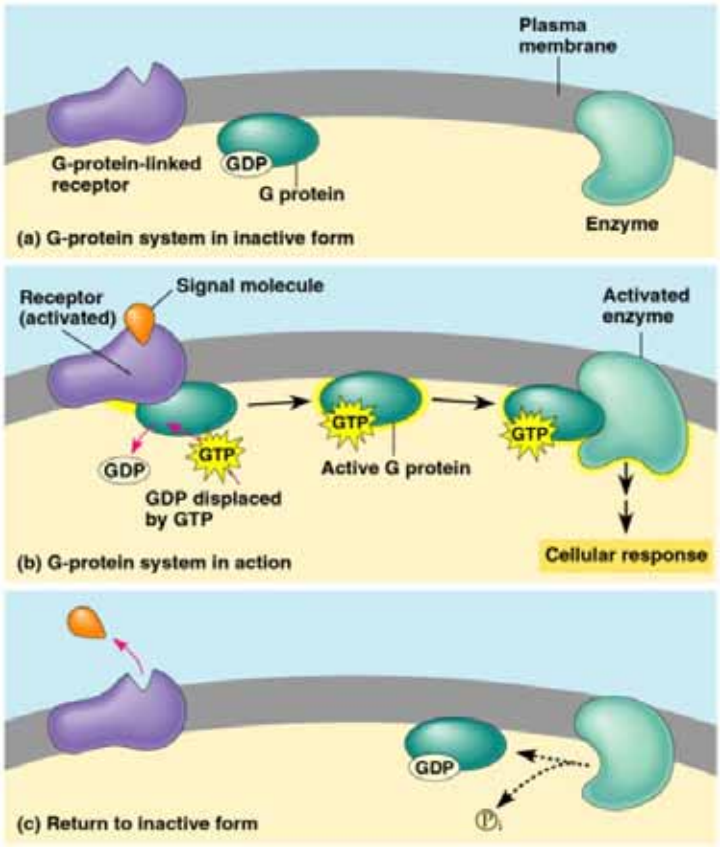


图 8-12 G 蛋白分子开关

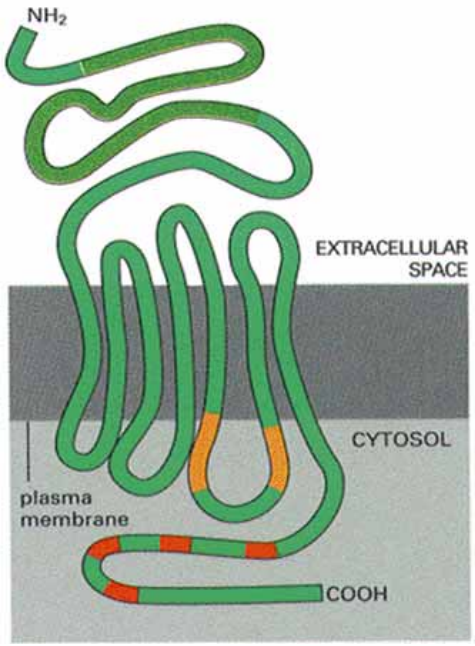


图 8-13 G 蛋白耦联型受体为 7 次跨膜蛋白

由 G 蛋白耦联受体所介导的细胞信号通路主要包括：cAMP 信号通路和磷脂酰

肌醇信号通路。

（一）cAMP 信号途径

在 cAMP 信号途径中，细胞外信号与相应受体结合，调节腺苷酸环化酶活性，通过第二信使 cAMP 水平的变化，将细胞外信号转变为细胞内信号。

1、cAMP 信号的组分

①. 激活型激素受体（Rs）或抑制型激素受体（Ri）；
②. 活化型调节蛋白（Gs）或抑制型调节蛋白（Gi）；
③. 腺苷酸环化酶（adenylate cyclase）：是相对分子量为 150KD 的糖蛋白，跨膜 12 次。在 Mg^{2+}或 Mn^{2+}的存在下，腺苷酸环化酶催化 ATP 生成 cAMP（图 8-14）。

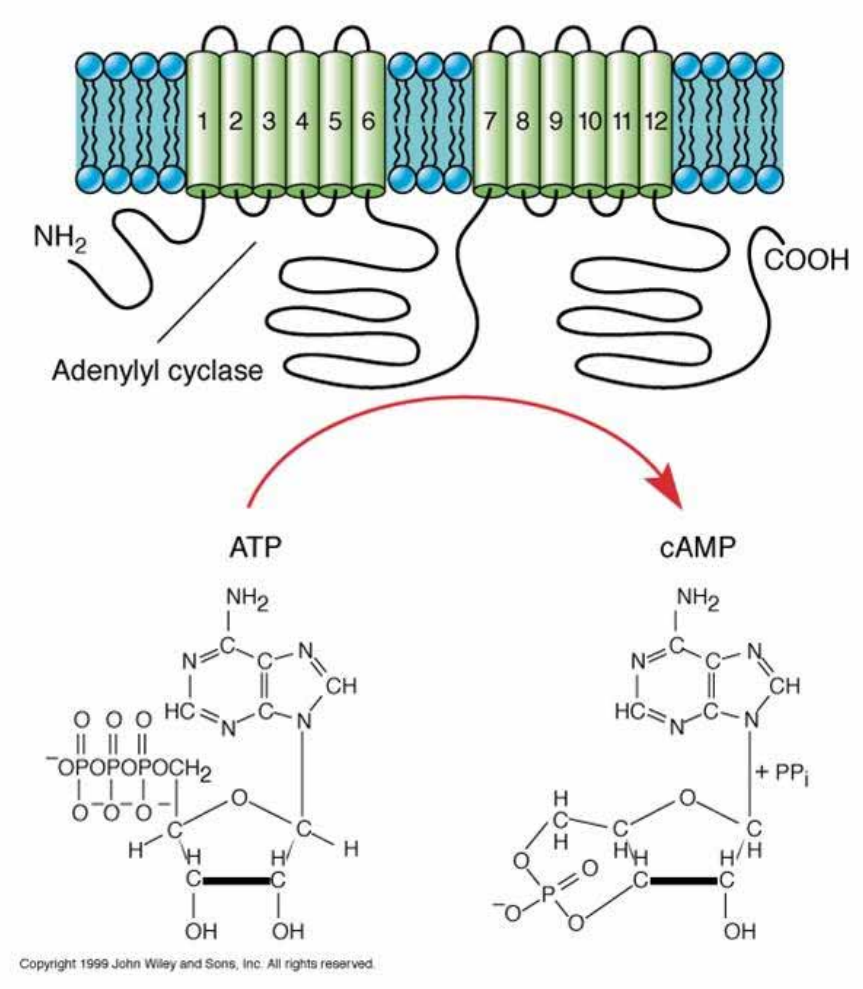


图 8-14 腺苷酸环化酶

④. 蛋白激酶 A（Protein Kinase A，PKA）：由两个催化亚基和两个调节亚基组成

（图 8-15），在没有 cAMP 时，以钝化复合体形式存在。cAMP 与调节亚基结合，改变调节亚基构象，使调节亚基和催化亚基解离，释放出催化亚基。活化的蛋白激酶 A 催化亚基可使细胞内某些蛋白的丝氨酸或苏氨酸残基磷酸化，于是改变这些蛋白的活性，进一步影响到相关基因的表达。

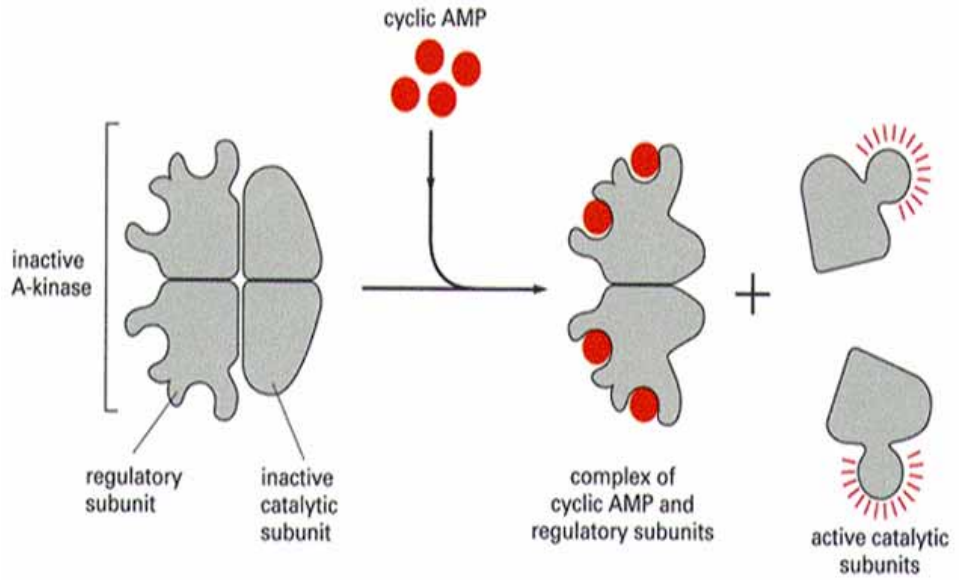


图 8-15 蛋白激酶 A

⑤. 环腺苷酸磷酸二酯酶（cAMP phosphodiesterase）：可降解 cAMP 生成 5’-AMP，起终止信号的作用（图 8-16）。

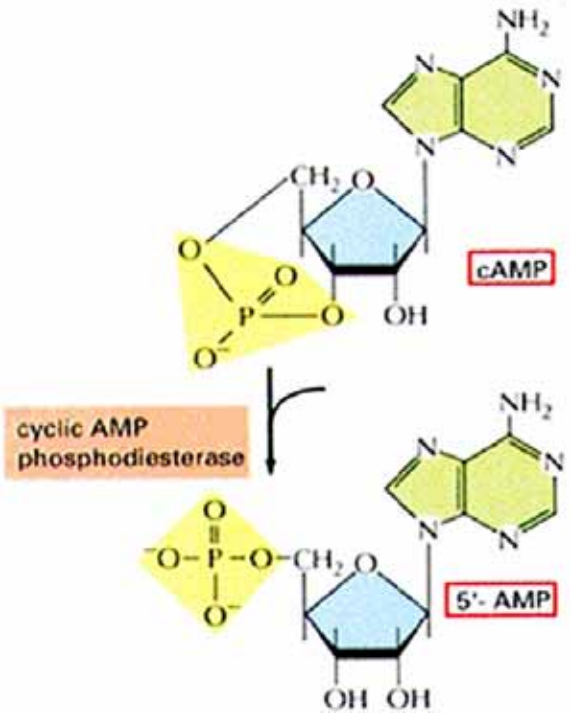


图 8-16 cAMP 的降解

2、Gs 调节模型

当细胞没有受到激素刺激，Gs 处于非活化态，α 亚基与 GDP 结合，此时腺苷酸环化酶没有活性；当激素配体与 Rs 结合后，导致 Rs 构象改变，暴露出与 Gs 结合的位点，使激素-受体复合物与 Gs 结合，Gs 的 α 亚基构象改变，从而排斥 GDP，结合 GTP 而活化，使三聚体 Gs 蛋白解离出 α 亚基和 βγ 基复合物，并暴露出 α 亚基与腺苷酸环化酶的结合位点；结合 GTP 的 α 亚基与腺苷酸环化酶结合，使之活化，并将 ATP 转化为 cAMP。随着 GTP 的水解 α 亚基恢复原来的构象并导致与腺苷酸环化酶解离，终止腺苷酸环化酶的活化作用。α 亚基与 βγ 亚基重新结合，使细胞回复到静止状态。

活化的 βγ 亚基复合物也可直接激活胞内靶分子，具有传递信号的功能，如心肌细胞中 G 蛋白耦联受体在结合乙酰胆碱刺激下，活化的 βγ 亚基复合物能开启质膜上的 K^+通道，改变心肌细胞的膜电位。此外 βγ 亚基复合物也能与膜上的效应酶结合，对结合 GTP 的 α 亚基起协同或拮抗作用。

霍乱毒素能催化 ADP 核糖基共价结合到 Gs 的 α 亚基上，致使 α 亚基丧失 GTP 酶的活性，结果 GTP 永久结合在 Gs 的 α 亚基上，使 α 亚基处于持续活化状态，腺苷酸环化酶永久性活化。导致霍乱病患者细胞内 Na^+和水持续外流，产生严重腹泻而脱水。

该信号途径涉及的反应链可表示为：

激素→G 蛋白耦联受体→G 蛋白→腺苷酸环化酶→cAMP→依赖 cAMP 的蛋白激酶 A→基因调控蛋白→基因转录（图 8-17）。

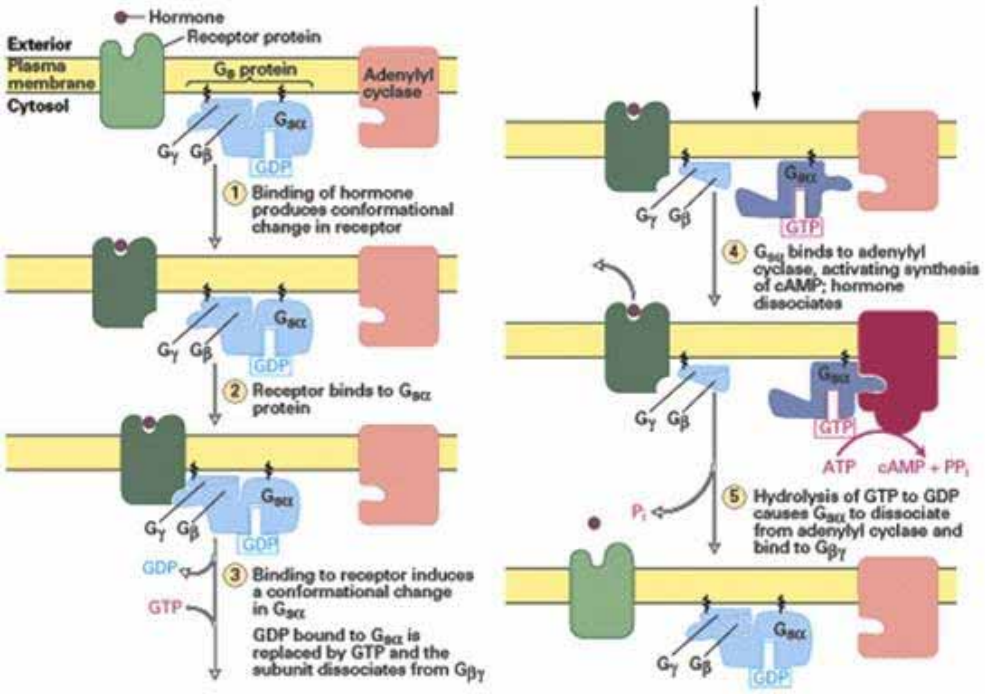


图 8-17 Gs 调节模型

不同细胞对 cAMP 信号途径的反应速度不同，在肌肉细胞 1 秒钟之内可启动糖

原降解为葡糖 1-磷酸（图 8-18），而抑制糖原的合成。在某些分泌细胞，需要几个小时， 激活的 PKA 进入细胞核，将 CRE 结合蛋白磷酸化，调节相关基因的表达。CRE（cAMP response element ）是 DNA 上的调节区域（图 8-19）。

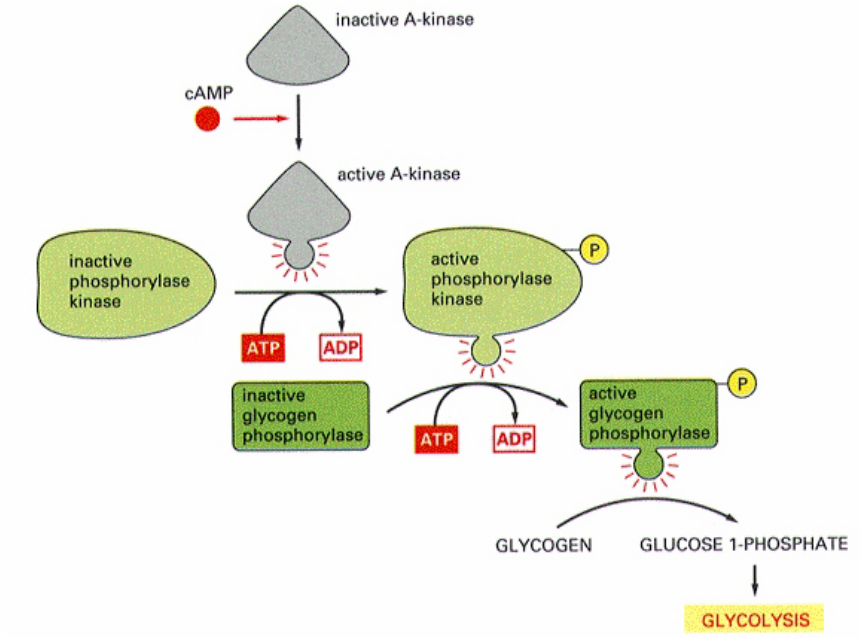


图 8-18 cAMP 信号与糖原降解

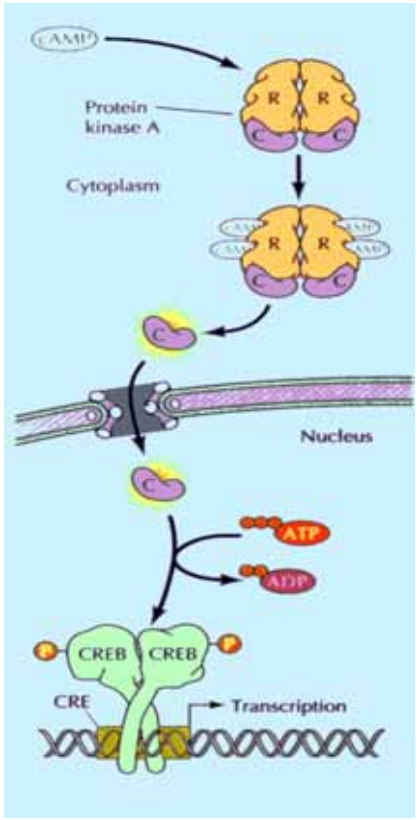


图 8-19 cAMP 信号与基因表达

3、Gi 调节模型

Gi 对腺苷酸环化酶的抑制作用可通过两个途径：①通过 α 亚基与腺苷酸环化酶结合，直接抑制酶的活性；②通过 βγ 亚基复合物与游离 Gs 的 α 亚基结合，阻断 Gs 的 α 亚基对腺苷酸环化酶的活化（图 8-20）。

百日咳毒素催化 Gi 的 α 亚基 ADP-核糖基化，结果降低了 GTP 与 Gi 的 α 亚基结合的水平，使 Gi 的 α 亚基不能活化，从而阻断了 Ri 受体对腺苷酸环化酶的抑制作用，但尚不能解释百日咳症状与这种作用机理有关。

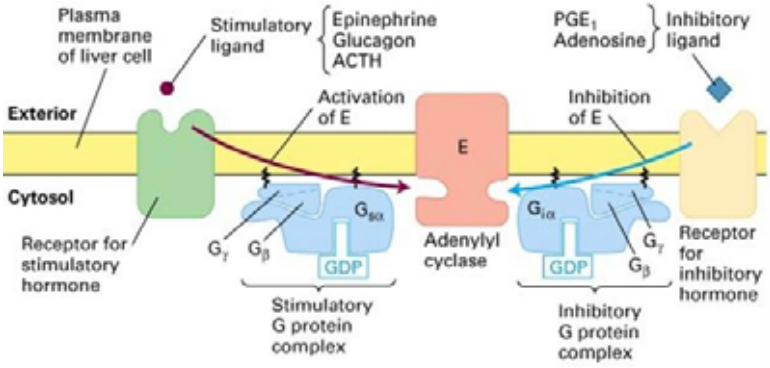


图 8-20 Gi 调节模型

（二）磷脂酰肌醇途径

在磷脂酰肌醇信号通路中胞外信号分子与细胞表面 G 蛋白耦联型受体结合，激活质膜上的磷脂酶 C（PLC-β），使质膜上 4，5-二磷酸磷脂酰肌醇（PIP_2）水解成 1，4，5-三磷酸肌醇（IP_3）和二酰基甘油（DG）两个第二信使，胞外信号转换为胞内信号（图 8-21），这一信号系统又称为“双信使系统”（double messenger system）。

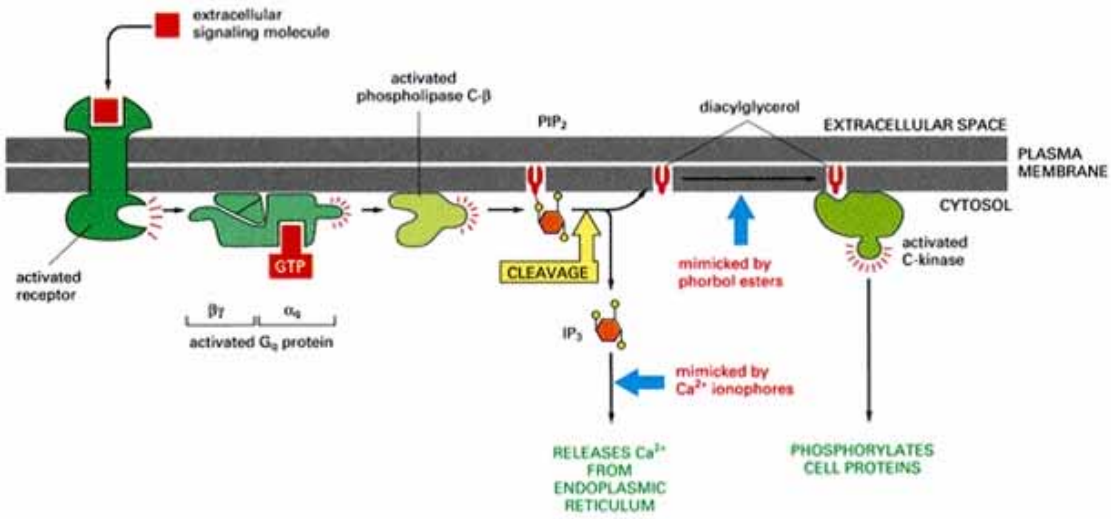


图 8-21 磷脂酰肌醇途径

IP_3 与内质网上的 IP_3 配体门钙通道结合，开启钙通道，使胞内 Ca^{2+} 浓度升高，激活各类依赖钙离子的蛋白。用 Ca^{2+} 载体离子霉素（ionomycin）处理细胞会产生类似的结果（图 8-22）。

DG 结合于质膜上，可活化与质膜结合的蛋白激酶 C（Protein Kinase C，PKC）。PKC 以非活性形式分布于细胞溶质中，当细胞接受刺激，产生 IP_3，使 Ca^{2+} 浓度升高，PKC 便转位到质膜内表面，被 DG 活化（图 8-22），PKC 可以使蛋白质的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化是不同的细胞产生不同的反应，如细胞分泌、肌肉收缩、细胞增殖和分化等。DG 的作用可用佛波醇酯（phorbol ester）模拟。

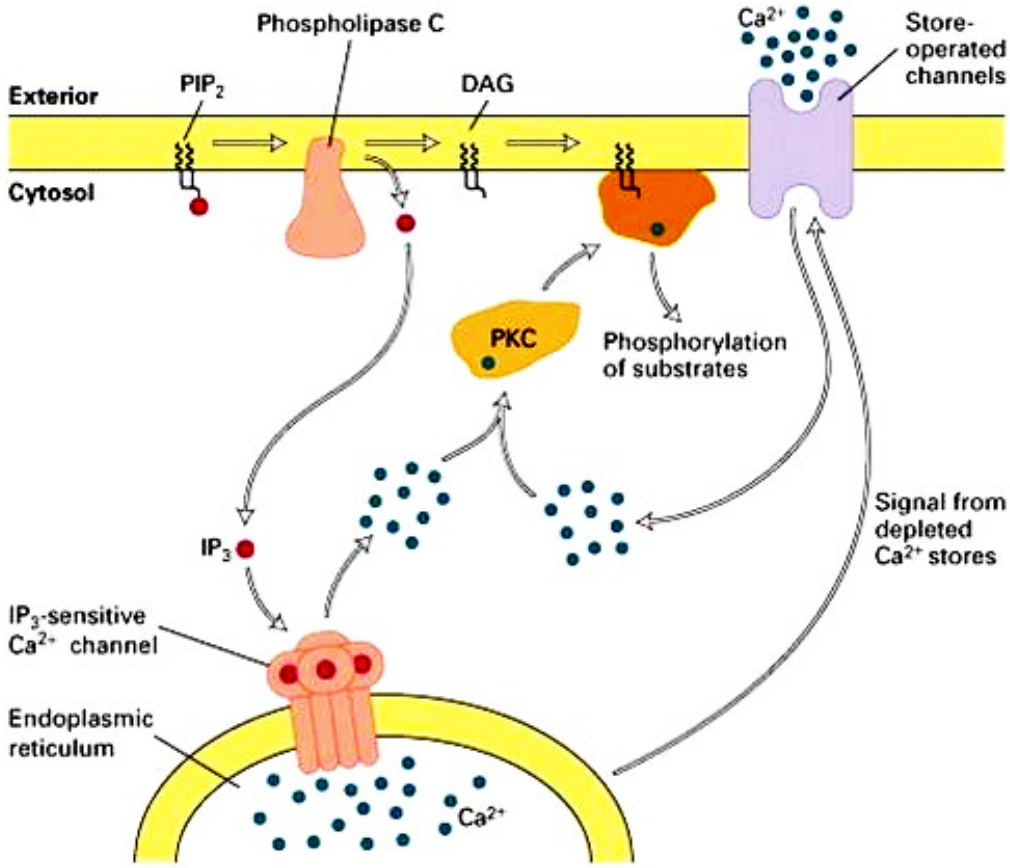


图 8-22 IP_3 和 DG 的作用

Ca^{2+} 活化各种 Ca^{2+} 结合蛋白引起细胞反应，钙调素（calmodulin，CaM）由单一肽链构成，具有四个钙离子结合部位。结合钙离子发生构象改变，可激活钙调素依赖性激酶（CaM-Kinase）。细胞对 Ca^{2+} 的反应取决于细胞内钙结合蛋白和钙调素依赖性激酶的种类。如：在哺乳类脑神经元突触处钙调素依赖性激酶 II 十分丰富，与记忆形成有关。该蛋白发生点突变的小鼠表现出明显的记忆无能。

IP_3 信号的终止是通过去磷酸化形成 IP_2，或被磷酸化形成 IP_4。Ca^{2+} 由质膜上的 Ca^{2+} 泵和 Na^+-Ca^{2+} 交换器将抽出细胞，或由内质网膜上的钙泵抽进内质网（图 8-23）。

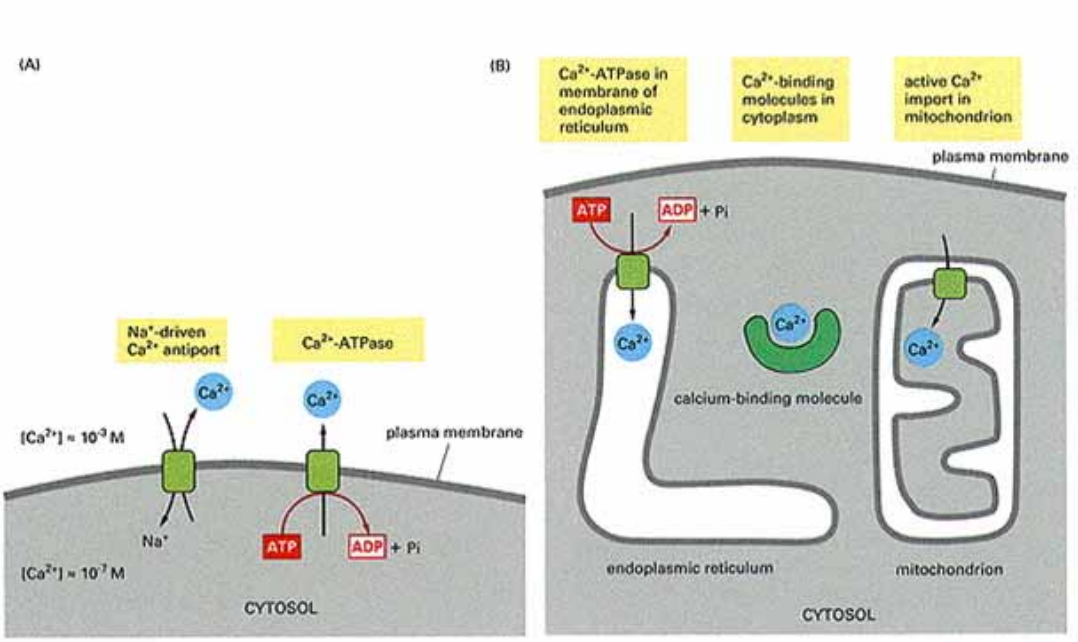


图 8-23 Ca^{2+}信号的消除

DG 通过两种途径终止其信使作用：一是被 DG-激酶磷酸化成为磷脂酸，进入磷脂酰肌醇循环；二是被 DG 酯酶水解成单酯酰甘油。由于 DG 代谢周期很短，不可能长期维持 PKC 活性，而细胞增殖或分化行为的变化又要求 PKC 长期活性所产生的效应。现发现另一种 DG 生成途径，即由磷脂酶催化质膜上的磷脂酰胆碱断裂产生的 DG，用来维持 PKC 的长期效应。

（三）其它 G 蛋白偶联型受体

1．化学感受器中的 G 蛋白

气味分子与化学感受器中的 G 蛋白偶联型受体结合，可激活腺苷酸环化酶，产生 cAMP，开启 cAMP 门控阳离子通道（cAMP-gated cation channel），引起钠离子内流，膜去极化，产生神经冲动，最终形成嗅觉或味觉。

2．视觉感受器中的 G 蛋白

黑暗条件下视杆细胞(或视锥细胞)中 cGMP 浓度较高，cGMP 门控钠离子通道开放，钠离子内流，引起膜去极化，突触持续向次级神经元释放递质。

视紫红质（rhodopsin, Rh）为 7 次跨膜蛋白，含一个 11 顺-视黄醛。是视觉感受器中的 G 蛋白偶联型受体，光照使 Rh 视黄醛的构象变为反式，Rh 分解为视黄醛和视蛋白（opsin），构象改变的视蛋白激活 G 蛋白（transducin, Gt），G 蛋白激活 cGMP 磷酸二酯酶，将细胞中的 cGMP 水解。从而关闭钠通道，引起细胞超极化，产生视觉。可见胞内 cGMP 水平下降的负效应信号起传递光刺激的作用（图 8-24）。

视觉感受器的换能反映可表述为：

光信号→Rh 激活→Gt 活化→cGMP 磷酸二酯酶激活→胞内 cGMP 减少→Na^+

离子通道关闭→离子浓度下降→膜超极化→神经递质释放减少→视觉反应。

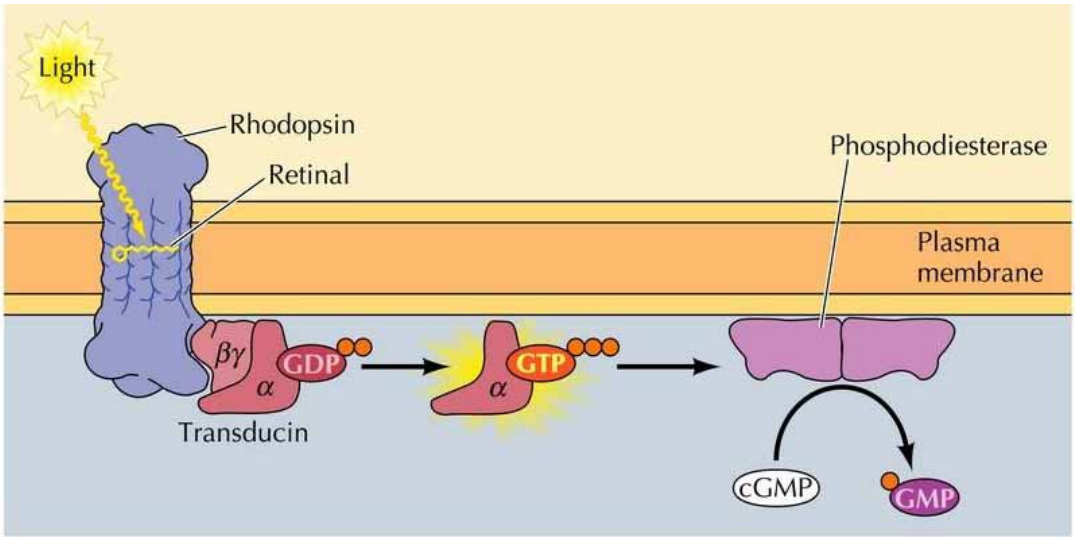


图 8-24 视觉感受器中的 G 蛋白

（四）小 G 蛋白

小 G 蛋白（Small G Protein）因分子量只有 20~30KD 而得名，同样具有 GTP 酶活性，在多种细胞反应中具有开关作用。第一个被发现的小 G 蛋白是 Ras，它是 ras 基因[16]的产物。其它的还有 Rho，SEC4，YPT1 等，微管蛋白 β 亚基也是一种小 G 蛋白。

小 G 蛋白的共同特点是，当结合了 GTP 时即成为活化形式，可作用于下游分子使之活化，而当 GTP 水解成为 GDP 时（自身为 GTP 酶）则回复到非活化状态。这一点与 Gα 类似，但是小 G 蛋白的分子量明显低于 Gα。

在细胞中存在着一些专门控制小 G 蛋白活性的小 G 蛋白调节因子，有的可以增强小 G 蛋白的活性，如鸟苷酸交换因子（guanine nucleotide exchange factor, GEF）和鸟苷酸解离抑制因子（Guanine nucleotide dissociation Inhibitor, GDI），有的可以降低小 G 蛋白活性，如 GTP 酶活化蛋白（GTPase activating protein, GAP）。

三、酶耦联型受体

酶偶联型受体（enzyme linked receptor）分为两类，其一是本身具有激酶活性，如肽类生长因子（EGF，PDGF，CSF 等）受体；其二是本身没有酶活性，但可以连接非受体酪氨酸激酶，如细胞因子受体超家族。这类受体的共同点是：①通常为单次跨膜蛋白[17]；②接受配体后发生二聚化而激活，起动其下游信号转导。

[16] rat sarcoma 的缩写。

[17]胰岛素和胰岛素样的生长因子－1(IGF-I)的受体有 α 和 β 两种亚基，组成四聚体型受体，其中β 亚基具有酪氨酸激酶活性。

已知六类：①受体酪氨酸激酶、②酪氨酸激酶连接的受体、③受体酪氨酸磷脂酶、④受体丝氨酸/苏氨酸激酶⑤受体鸟苷酸环化酶、⑥组氨酸激酶连接的受体（与细菌的趋化性有关）。

（一）受体酪氨酸激酶

1、酪氨酸激酶

酪氨酸激酶可分为三类：①受体酪氨酸激酶，为单次跨膜蛋白，在脊椎动物中已发现 50 余种；②胞质酪氨酸激酶，如 Src 家族、Tec 家族、ZAP70、家族、JAK 家族等；③核内酪氨酸激酶 如 Abl 和 Wee。

受体酪氨酸激酶（receptor protein tyrosine kinases，RPTKs）的胞外区是结合配体结构域，配体是可溶性或膜结合的多肽或蛋白类激素，包括胰岛素和多种生长因子。胞内段是酪氨酸蛋白激酶的催化部位，并具有自磷酸化位点（图 8-25）。

配体（如 EGF）在胞外与受体结合并引起构象变化，导致受体二聚化（dimerization）形成同源或异源二聚体，在二聚体内彼此相互磷酸化胞内段酪氨酸残基，激活受体本身的酪氨酸蛋白激酶活性。这类受体主要有 EGF、PDGF、FGF 等（图 8-26）。

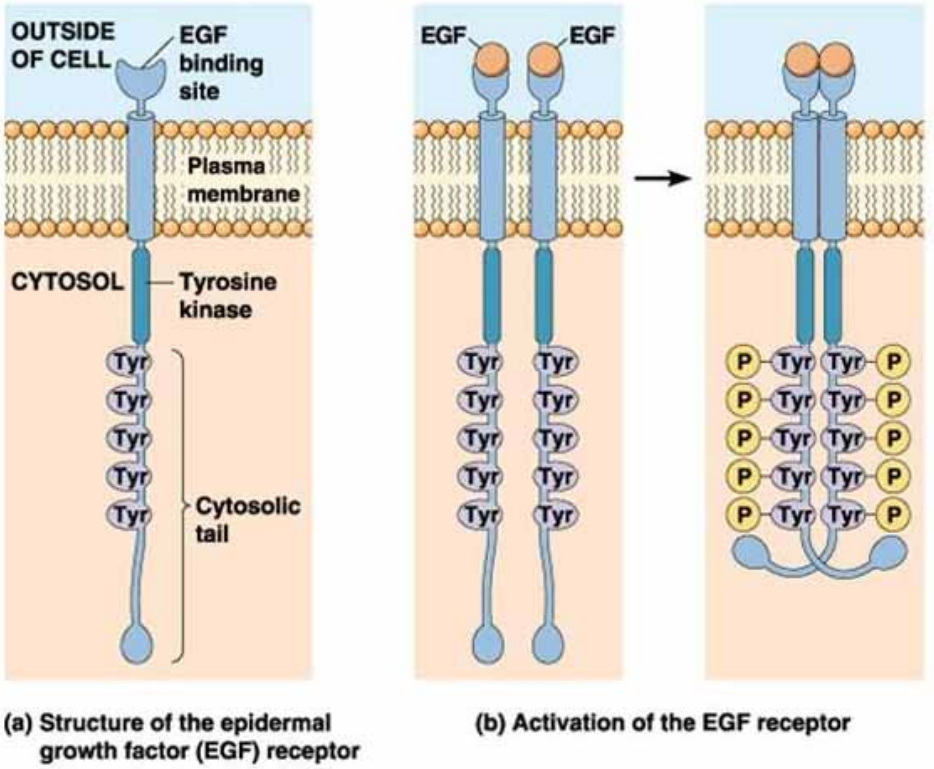


图 8-25 受体酪氨酸激酶的二聚化和自磷酸化

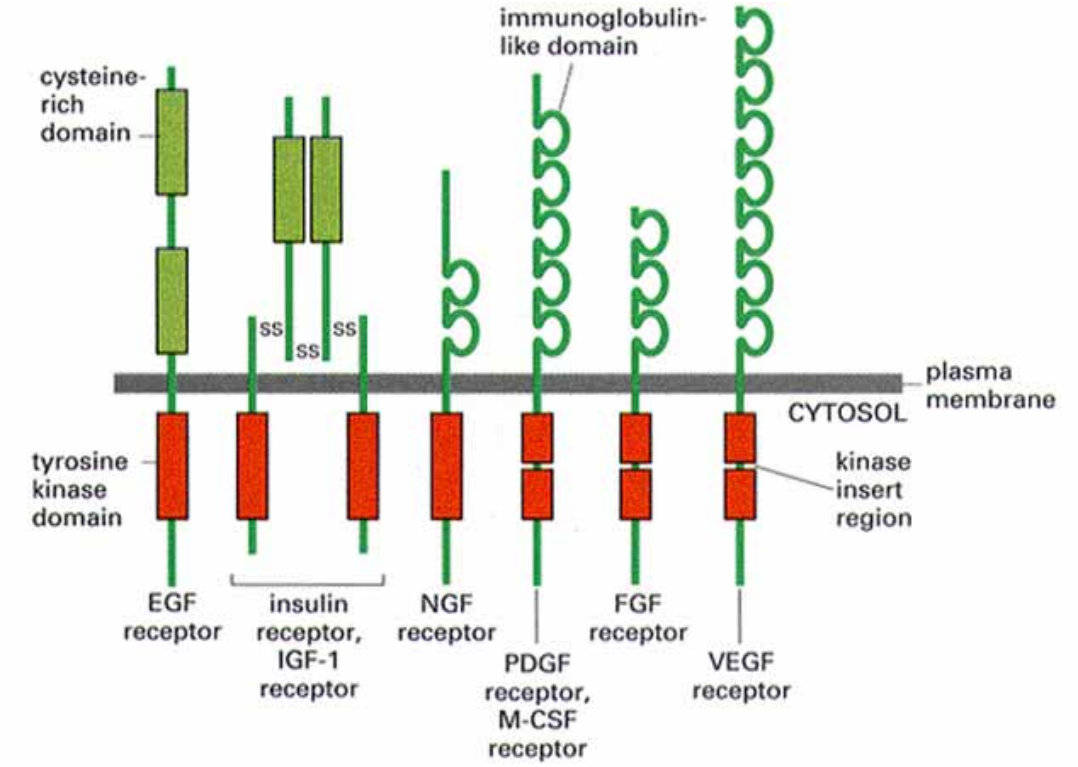


图 8-26 各类受体酪氨酸激酶

2、信号分子间的识别结构域

信号转导分子中存在着一些大约由 50~100 个氨基酸构成的结构域，它们在不同的信号转导分子中具有很高的同源性。这些结构域的作用是在细胞中介导信号介导分子的相互识别和连接，共同形成不同的信号转导途径（Signal transduction pathway），如电脑的接口一样把不同的设备连接起来，形成信号转导网络（Signal transduction network）。与细胞信号分子识别有关的结构域主要有：

SH2 结构域（Src Homology 2 结构域）：约 100 个氨基酸组成，介导信号分子与含磷酸酪氨酸的蛋白分子结合。

SH3 结构域（Src Homology 3 结构域）：约 50~100 个氨基酸组成，介导信号分子与富含脯氨酸的蛋白分子结合。

PH 结构域（Pleckstrin Homology 结构域）：约 100~120 个氨基酸组成，可以与膜上磷脂类分子 PIP_2、PIP_3、IP_3 等结合，使含 PH 结构域蛋白由细胞质中转位到细胞膜上。

3、RAS 信号途径

受体酪氨酸激酶（RPTK）结合信号分子，形成二聚体，并发生自磷酸化而活化，活化的 RPTK 激活 RAS，由活化的 RAS 引起蛋白激酶的磷酸化级联反应（图 8-27）。

Ras 蛋白要释放 GDP，结合 GTP 的才能激活，GDP 的释放需要鸟苷酸交换因子（GEF，如 Sos）参与；Sos 有 SH_3 结构域，但没有 SH_2 结构域，因此不能直接和受体结合，需要接头蛋白（如 Grb2）的连接，接头蛋白通过 SH_2 与受体的磷酸酪氨酸残基结合，再通过 SH_3 与 Sos 结合，Sos 与膜上的 Ras 接触，从而活化 Ras。

Ras 本身的 GTP 酶活性不强，需要 GTP 酶活化蛋白（GAP）的参与，使 Ras 结合的 GTP 水解而失活，GAP 具有 SH_2 结构域可直接与活化的受体结合。

Ras 蛋白与 Raf 的 N 端结构域结合并使其激活，Raf 是丝氨酸/苏氨酸（Ser/Thr）蛋白激酶（又称 MAPKKK）

活化的 Raf 结合并磷酸化另一种蛋白激酶 MAPKK，使其活化。

MAPKK 又使 MAPK 的苏氨酸和酪氨酸残基使之激活。

MAPK 为有丝分裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK），属丝氨酸/苏氨酸残激酶。活化的 MAPK 进入细胞核，可使许多转录因子活化，如将 Elk-1 激活，促进 c-fos，c-jun 的表达。

RPTK-Ras 信号通路可概括如下：

配体→RPTK→adaptor→GEF→Ras→Raf（MAPKKK）→MAPKK →MAPK→进入细胞核→转录因子→基因表达。

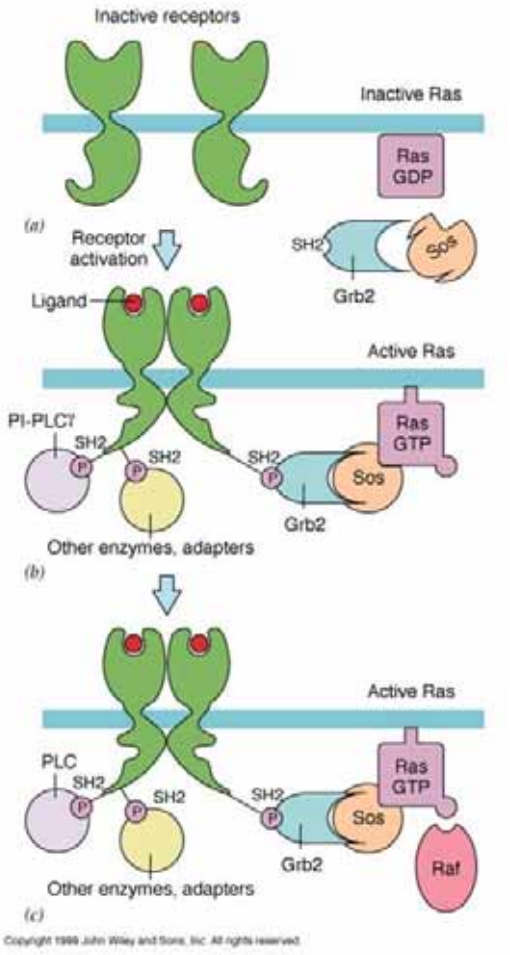


图 8-27 RAS 信号途径

4．胰岛素受体介导的信号转导

胰岛素受体也属于受体酪氨酸激酶，是由 α 和 β 两种组成四聚体型受体，其中 β 亚基具有激酶活性，可将胰岛素受体底物（insulin receptor substrates, IRSs）磷酸化（图 8-28），IRS 作为多种蛋白的停泊点，可以结合或激活具有 SH2 结构域的蛋白。如磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphotidylinositol 3-kinase, PI3K）。

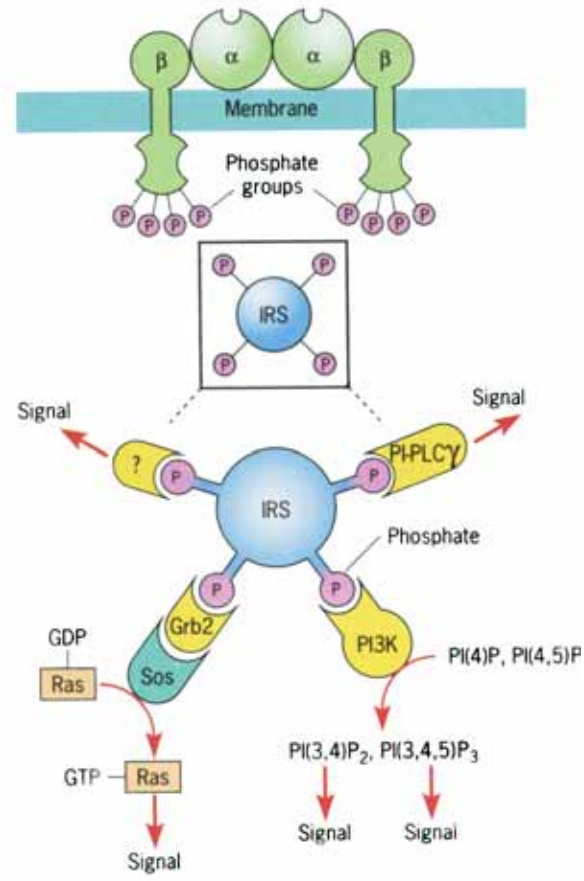


图 8-28 IRS

PI3K 催化 PI 形成 $PI(3,4)P_2$ 和 $PI(3,4,5)P_3$，这两种磷酸肌醇可作为胞内信号蛋白（含 PH 结构域）的停泊位点，激活这些蛋白。其信号通路主要有：

①通过激活 BTK（Bruton's tyrosine kinase），再激活磷脂酶 Cγ（PLCγ），引起磷脂酰肌醇途径。

②激活磷脂酰肌醇依赖性激酶 PKD1（phosphoinositol dependent kinase），PKD1 激活转位到膜上的蛋白激酶 B（PKB，一种丝氨酸/苏氨酸激酶，如 Akt）。激活的 PKB 返回细胞质，将细胞调亡相关的 BAD 蛋白磷酸化，抑制 BAD 的活性，从而使细胞存活（图 8-29）。

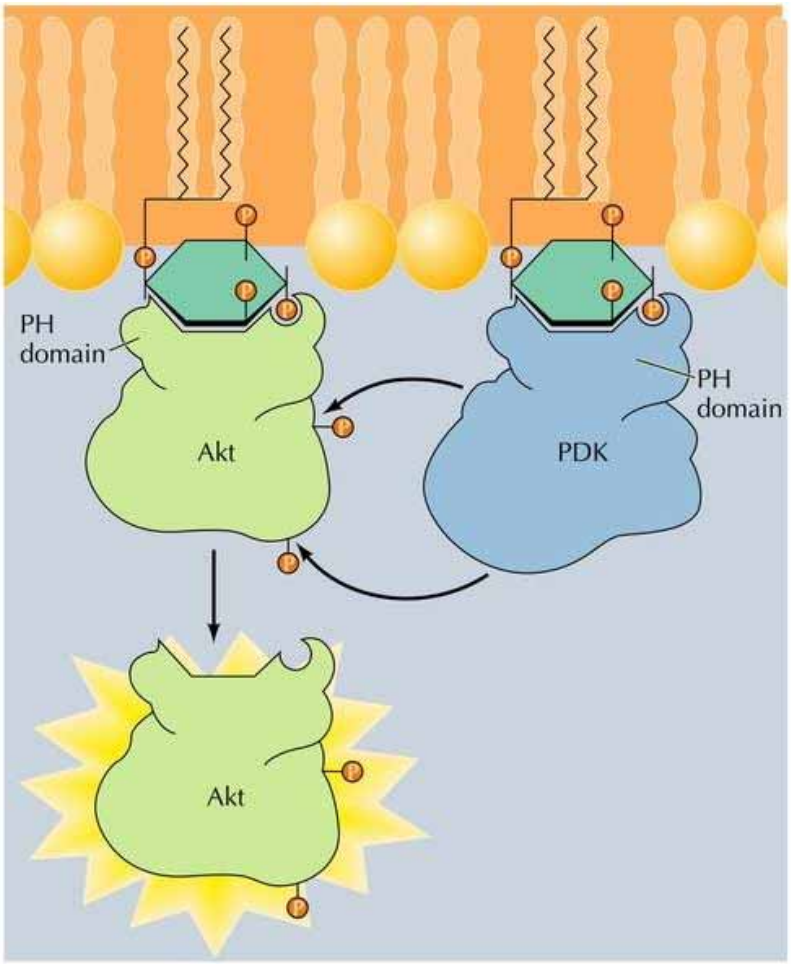


图 8-29 蛋白激酶 B 的活化

（二）受体丝氨酸/苏氨酸激酶

受体丝氨酸/苏氨酸激酶（receptor serine/threonine kinases）是单次跨膜蛋白受体，在胞内区具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性，该受体以异二聚体行使功能。主要配体是转化生长因子-β_s。（transforming growth factor-β_s，TGF-β_s。）家族成员，包括 TGF-β_1~TGF-β_5，这些成员具有类似结构与功能，对细胞具有多方面的效应。依细胞类型不同，可能抑制细胞增殖、刺激胞外基质合成、刺激骨骼的形成、通过趋化性吸引细胞和作为胚胎发育过程中诱导信号等。

（三）受体酪氨酸磷酯酶

受体酪氨酸磷酯酶（receptor tyrosine phosphatases）为单次跨膜蛋白受体，受体胞内区具有蛋白酪氨酸磷酯酶的活性，胞外配体与受体结合激发该酶活性，使特异的胞内信号蛋白的磷酸酪氨酸残基去磷酸化，其作用是控制磷酸酪氨酸残基的

寿命，使静止细胞具有较低的磷酸酪氨酸残基的水平。它的作用不是简单的与 RPTK 相反，可能与酪氨酸激酶一起协同工作，如参与细胞周期调控。白细胞表面的 CD45 属这类受体，对具体配体的尚不了解。

和酪氨酸激酶一样存在胞质酪氨酸磷酯酶。胞质酪氨酸磷酯酶胞内段具有两个 SH 结构域，称作 SHP1 和 SHP2，通过 SHP1 可以与细胞因子受体连接，使 Jak 去磷酸化，SHP1 结构域缺陷的老鼠，各类血细胞异常。说明胞质酪氨酸磷酯酶与血细胞分化有关。

（四）受体鸟苷酸环化酶

受体鸟苷酸环化酶（receptor guanylate cyclase）是单次跨膜蛋白受体，胞外段是配体结合部位，胞内段为鸟苷酸环化酶催化结构域。受体的配体心房排钠肽（atrial natriuretic peptides，ANPs）和脑排钠肽（brain natriuretic peptides，BNPs）。当血压升高时，心房肌细胞分泌 ANPs，促进肾细胞排水、排钠，同时导致血管平滑肌细胞松弛，结果使血压下降。介导 ANP 反应的受体分布在肾和血管平滑肌细胞表面。ANPs 与受体结合直接激活胞内段鸟苷酸环化酶的活性，使 GTP 转化为 cGMP，cGMP 作为第二信使结合并激活 cGMP 依赖的蛋白激酶 G（PKG），导致靶蛋白的丝氨酸/苏氨酸残基活化。

除了与质膜结合的鸟苷酸环化酶外，在细胞质基质中还存在可溶性的鸟苷酸环化酶，它们是 NO 作用的靶酶，催化产生 cGMP。

（五）细胞因子受体超家族

属于酪氨酸激酶连接的受体（tyrosine kinase associated receptor）。细胞因子（cytokine），如：白介素（IL）、干扰素（IFN）、集落刺激因子（CSF）、生长激素（GH）等，在造血细胞和免疫细胞通讯上起作用，这类细胞因子的受体为单次跨膜蛋白，本身不具有酶活性，但与配体结合后发生二聚化而激活，罗织或连接胞内酪氨酸蛋白激酶（如，JAK），其信号途径为 JAK－STAT 或 RAS 途径。

JAK（just another kinase 或 janus kinase）是一类非受体酪氨酸激酶家族，已发现四个成员，即 JAK_1 、JAK_2 、JAK_3 和 TYK_1，其结构不含 SH_2 、SH_3，C 段具有两个相连的激酶区。

JAK 的底物为 STAT，即信号转导子和转录激活子（signal transducer and activator of transcription，STAT），具有 SH_2 和 SH_3 两类结构域。STAT 被 JAK 磷酸化后发生二聚化，然后穿过核膜进入核内调节相关基因的表达，这条信号通路称为 JAK-STAT 途径（图 8-30），可概括如下：

1、配体与受体结合导致受体二聚化；
2、二聚化受体激活 JAK；
3、JAK 将 STAT 磷酸化；
4、STAT 形成二聚体，暴露出入核信号；

5、 STAT 进入核内，调节基因表达。

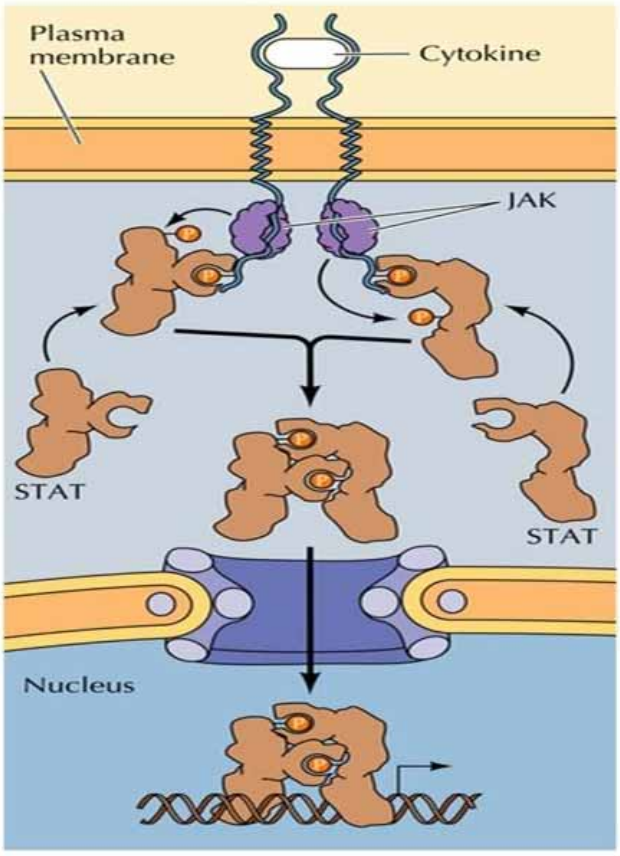


图 8-30 JAK-STAT 信号途径

第三节　胞内受体介导的信号传导

细胞内受体的本质是激素激活的基因调控蛋白（图 8-31）。在细胞内，受体与抑制性蛋白（如 Hsp90）结合形成复合物，处于非活化状态。配体（如皮质醇）与受体结合，将导致抑制性蛋白从复合物上解离下来，从而使受体暴露出 DNA 结合位点而被激活。这类受体一般都有三个结构域：位于 C 端的激素结合位点，位于中部富含 Cys、具有锌指结构的 DNA 或 Hsp90 结合位点，以及位于 N 端的转录激活结构域。

甾类激素分子是化学结构相似的亲脂性小分子，分子相对质量为 300Da 左右，可以通过简单扩散跨越质膜进入细胞内。每种类型的甾类激素与细胞质内各自的受体蛋白结合，形成激素-受体复合物，并能穿过核孔进入细胞核内，激素和受体的结合导致受体蛋白构象的改变，提高了受体与 DNA 的结合能力，激活的受体通过结合于特异的 DNA 序列调节基因表达。受体结合 DNA 序列是受体依赖的转录增强子，这种结合可增加某些相邻基因的转录水平。

甾类激素诱导的基因活化分为两个阶段：①直接活化少数特殊基因转录的初级

反应阶段，发生迅速；②初级反应的基因产物再活化其他基因产生延迟的次级反应，对初级反应起放大作用。如果蝇注射蜕皮激素后仅 5～10min 便可诱导唾腺染色体上 6 个部位的 RNA 转录，再过一段时间至少有 100 个部位合成 RNA，致使大量合成次级反应所特有的蛋白质产物。这类激素作用通常表现为影响如细胞分化等长期的生物学效应。

甲状腺素和雌激素也是亲脂性小分子，其受体位于细胞核内，作用机理与甾类激素相同。也有个别的亲脂性小分子，如前列腺素，其受体在细胞膜上。

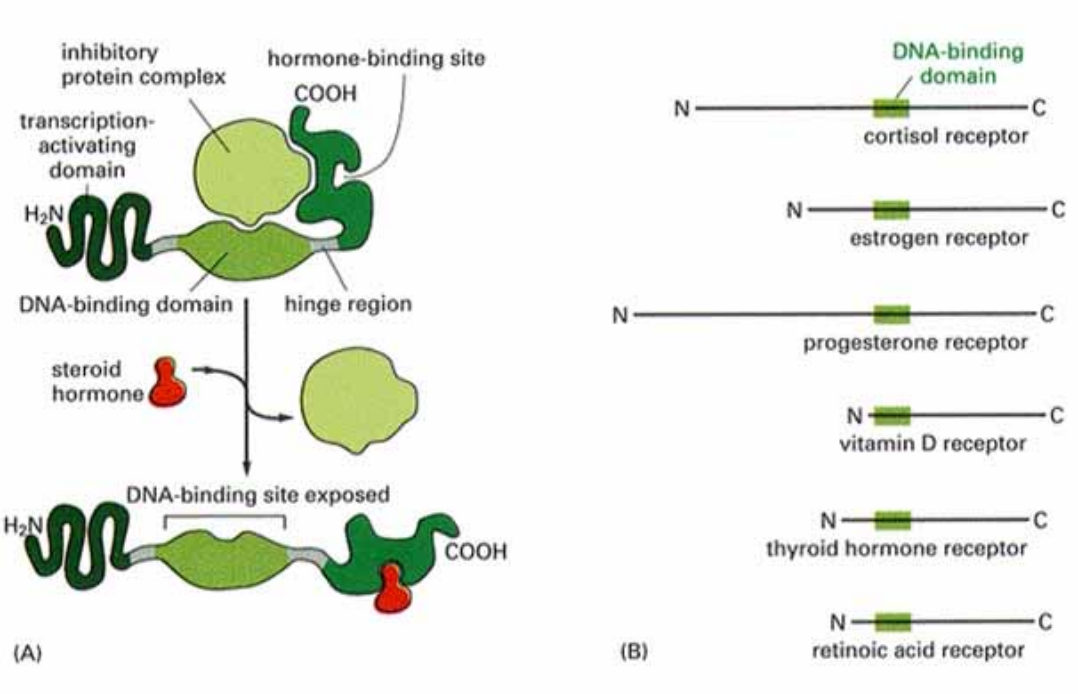


图 8-31 胞内受体

NO 是另一种可进入细胞内部的信号分子，能快速透过细胞膜，作用于邻近细胞。R．Furchgott 等三位美国科学家因发现 NO 作为信号分子而获得 1998 年诺贝尔医学与生理学奖。

血管内皮细胞和神经细胞是 NO 的生成细胞，NO 的生成由一氧化氮合酶（nitric oxide synthase，NOS）催化，以 L 精氨酸为底物，以还原型辅酶 II（NADPH）作为电子供体，生成 NO 和 L 瓜氨酸。NO 没有专门的储存及释放调节机制，靶细胞上 NO 的多少直接与 NO 的合成有关。

血管内皮细胞接受乙酰胆碱，引起胞内 Ca^{2+}浓度升高，激活一氧化氮合酶，细胞释放 NO，NO 扩散进入平滑肌细胞，与胞质鸟苷酸环化酶（GTP-cyclase，GC）活性中心的 Fe^{2+}结合，改变酶的构象（图 8-32），导致酶活性的增强和 cGMP 合成增多（图 8-33）。cGMP 可降低血管平滑肌中的 Ca^{2+}离子浓度。引起血管平滑肌的舒张，血管扩张、血流通畅。

硝酸甘油治疗心绞痛具有百年的历史，其作用机理是在体内转化为 NO，可舒张血管，减轻心脏负荷和心肌的需氧量。

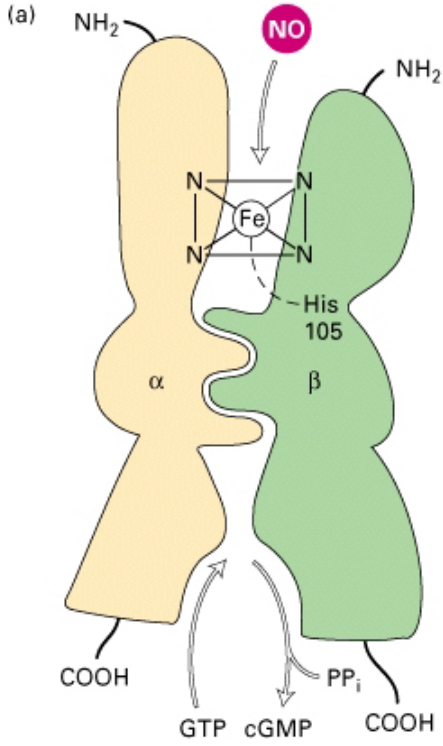


图 8-32 鸟苷酸环化酶

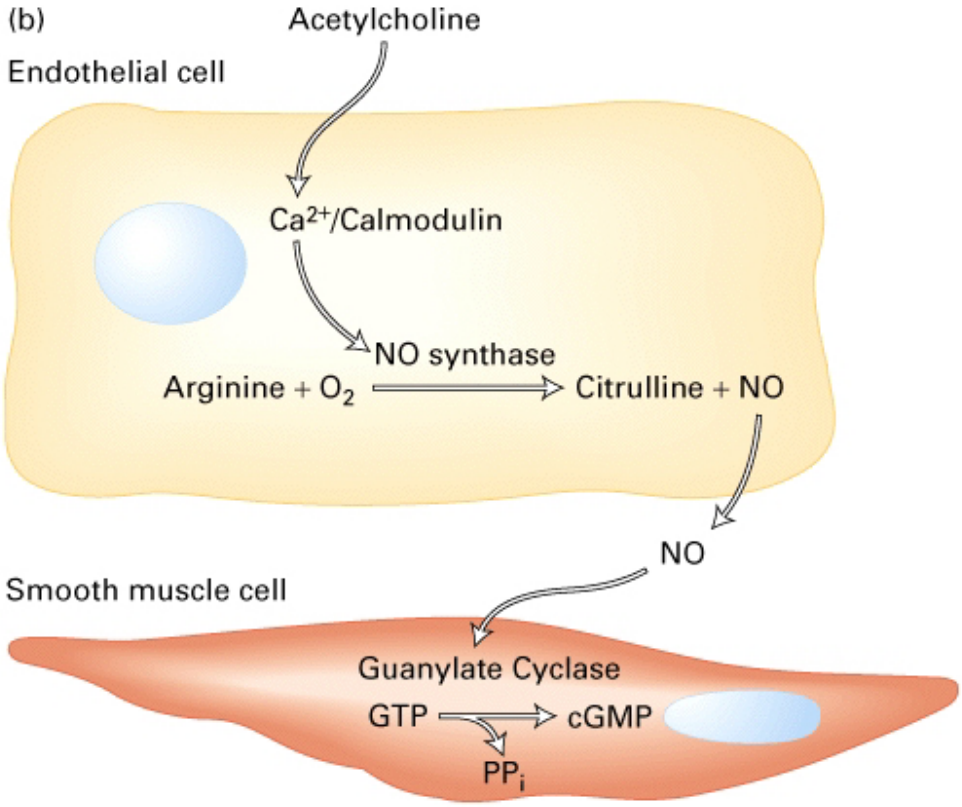


图 8-33 NO 的作用机制

第四节 蛋白降解与信号转导

在动物的发育过程中涉及极其复杂的信号转导过程，除了前面几节提到的信号途径以外，还有可控性蛋白水解相关的信号途径，如 Wnt、Hedgehog、Notch、NF-κB 等信号途径，这些信号途径往往影响相邻细胞的分化，称为侧向信号发放（lateral signaling）。

一、Wnt 信号途径

Wnt是一类分泌型糖蛋白，通过自分泌或旁分泌发挥作用。在小鼠中，肿瘤病毒整合在Wnt之后而导致乳腺癌，命名为Int1，它与果蝇的无翅基因（Wingless，wg）有高度同源性。Wnt信号途径能引起胞内β-连锁蛋白（β-catenin）积累。β-catenin（在果蝇中叫做犰狳蛋白Armadillo）是一种多功能的蛋白质，在细胞连接处它与钙粘素相互作用，参与形成粘合带，而游离的β-catenin可进入细胞核，调节基因表达。Wnt信号在动物发育中起重要作用，其异常表达或激活能引起肿瘤。

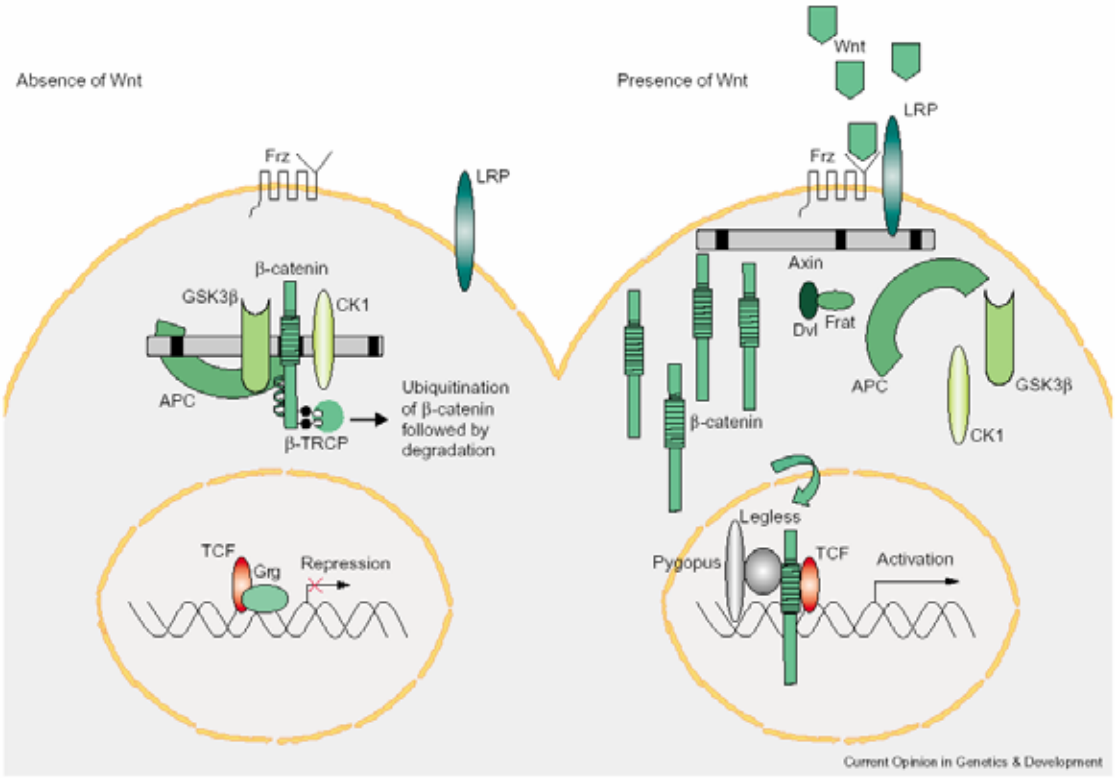


图8-34 Wnt信号途径 引自Johan H. van ES 2003

Wnt的受体是卷曲蛋白（frizzled，Frz），为7次跨膜蛋白，结构类似于G蛋白偶联型受体，Frz胞外N端具有富含半胱氨酸的结构域（cysteine rich domain，CRD），能与Wnt结合。Frz作用于胞质内的蓬乱蛋白（Dishevelled，Dsh或Dvl），Dsh能切

断β-catenin的降解途径，从而使β-catenin在细胞质中积累，并进入细胞核，与T细胞因子（T cell factor / lymphoid enhancer factor，TCF/LEF）相互作用，调节靶基因的表达，TCF/ LEF是一类具有双向调节功能的转录因子，它与Groucho结合抑制基因转录，而与结合β-catenin则促进基因转录。Wnt还需要另外一个受体（co-receptor），即LRP5/6，属于低密度脂蛋白受体相关蛋白（LDL-receptor-related protein，LRP），但至今还不清楚它如何与Frz一起活化Dsh。

Wnt信号途径可概括为（图8-34）：Wnt→Frz→Dsh→β-catenin的降解复合体解散→β-catenin积累，进入细胞核→TCF/LEF→基因转录（如c-myc、cyclinD1）。

β-catenin的降解复合体：主要由APC、Axin、GSK-3β、CK1等构成。

GSK-3β：是一种蛋白激酶，在没有Wnt信号时，GSK-3β能将磷酸基团加到β-catenin氨基端的丝氨酸/苏氨酸残基上，磷酸化的β-catenin再结合到β-TRCP蛋白上[18]，受泛素[19]的共价修饰，被蛋白酶体（proteasome）降解。β-catenin中被GSK3磷酸化的氨基酸序列称为破坏盒（destruction box），此序列发生变异可能引起某些癌症。

CK1：酪蛋白激酶（casein kinase 1），能将 β-catenin 的 Ser45 磷酸化，随后 GSK-3β 将 β-catenin 的 Thr41、Ser37、Ser33 磷酸化（图 8-35）。

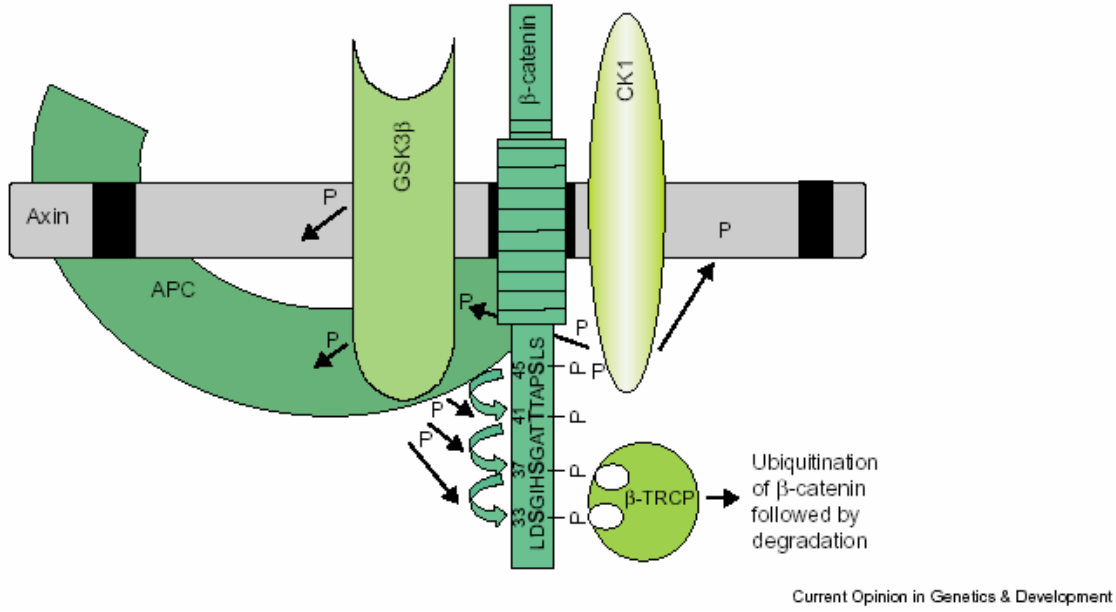


图 8-35 β-catenin 的磷酸化 引自 Johan H. van ES 2003

APC：是一种抑癌基因，其突变引起良性肿瘤——结肠腺瘤样息肉（adenomatous polyposis coli），但随着时间的推移，可能发生恶变。APC蛋白的作用是增强降解复合体与β-catenin的亲和力。

Axin：是一种支架蛋白，具有多个与其它蛋白作用的位点，能将 APC、GSK-3β、β-catenin 、CK1 结合在一起。此外它还能与 Dishevelled 、PP2A（protein phosphatase 2A）等成分结合，其中 Dsh 与 Axin 结合能使降解复合体解体。PP2A

[18]泛素连接酶 E3 的组成成分。

[19] 由 76 个氨基酸组成，高度保守。共价结合泛素的蛋白质能被蛋白酶体识别和降解，这是细胞内短寿命蛋白和一些异常蛋白降解的普遍途径。

可能引起 Axin 去磷酸化，而使降解复合体解体，因此属于 Wnt 途径的正调控因子，但 PP2A 至少由催化亚基和调节亚基两部分构成，其调节亚基仍算作是抑癌基因。

Wnt信号途径的其它成分：

GBP：GSK-3β 结合蛋白（Frat 基因的产物），对 Wnt 信号途径起正调控作用，GBP/Frat 抑制 GSK3-β 的活性。

Dickkopf1（DKK1）：是一种分泌蛋白，其与Wnt受体LRP5/6及另一类穿膜蛋白Kremen1/2结合，形成三聚体，诱导快速的细胞内吞，减少细胞膜上的LRP5/6，由此阻断了Wnt信号向胞内的传递。

sFRP：分泌型 Frz 相关蛋白（secreted frizzled-related proteins），含有一个 CRD 结构域，但缺少七次跨膜域，它可能与 Frz 竞争结合 Wnt 蛋白。其他的抑制蛋白还有 Sizzled、WIF-1 和 Cerberus，它们也直接与 Wnt 蛋白结合，从而拮抗 Wnt 信号。

二、Notch 信号途径

Notch基因最早发现于果蝇，部分功能缺失导致翅缘缺刻（notches，图8-36）。在胚胎发育中，当上皮组织的前体细胞中分化出神经元细胞后，其细胞表面Notch配体Delta与相邻细胞膜上的Notch结合，启动信号途径，防止其它细胞发生同样的分化，这种现象叫作侧向抑制（lateral inhibition）。Notch突变的半合子[20]或纯合子在胚胎期死亡，其胚胎中神经组织取代了上皮组织从而使神经组织异常丰富。

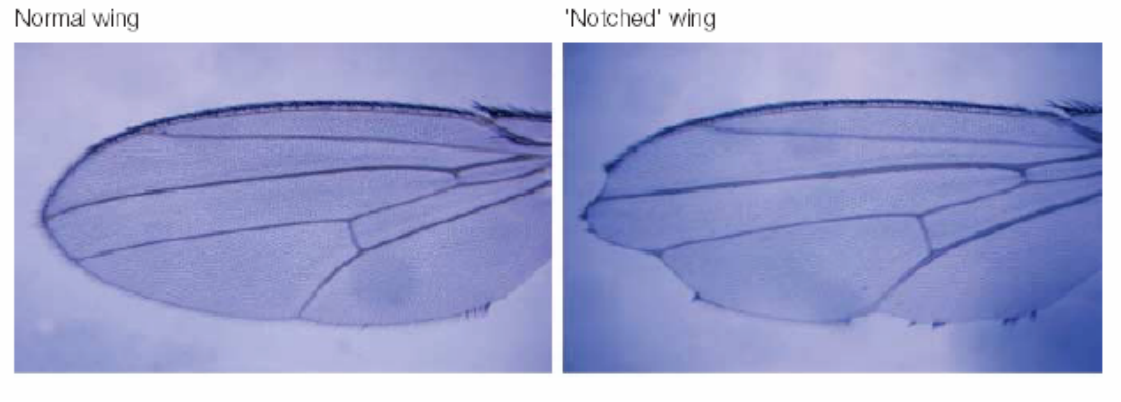


图8-36 Notch缺陷引起果蝇翅缘缺刻

Notch信号途径由Notch、Notch配体（DSL蛋白）和CSL（一类DNA结合蛋白）等组成。Notch及其配体均为单次跨膜蛋白，当配体（如Delta）和相邻细胞的Notch结合后，Notch被蛋白酶体切割，释放出具有核定位信号的胞质区ICN（intracellular domain of Notch），进入细胞核与CLS结合，调节基因表达。可概括为（图8-37）：Delta→Notch→酶切→ICN→进入细胞核→CLS-ICN复合体→基因转录。

Notch：为分子量约300KD的蛋白质，果蝇只有1个Notch基因，人类4个（Notch1-4）。Notch的胞外区是结合配体的区域，具有不同数量的EGF样重复序列（EGF-R）和3个LNR（Lin/Notch repeats）。胞内区由RAM（RBP-J kappa associated molecular）结构域、6个锚蛋白（cdc10/ankyrin，ANK）重复序列、2

[20]半合子（hemizygote），虽然是二倍体，但一个或多个基因是单价的，没有与之相对应的等位基因。

个核定位信号[21]（NLS）和PEST结构域。RAM结构域是与CSL结合的区域，PEST结构域与Notch的降解有关。Notch蛋白要经过三次切割，第一次在高尔基体内被furin切割为2个片断，转运到细胞膜形成异二聚体。当配体结合到胞外区，Notch蛋白又发生两次断裂，先是被肿瘤坏死因子-α-转化酶（TNF-α-converting enzyme，TACE）切割，然后被γ-促分泌酶（γ-secretase）切割，后者需要早老蛋白（presenilin，PS）参与。酶切以后释放Notch胞内区ICN，进入细胞核发挥生物学作用。

Notch配体：在果蝇中Notch个配体为Delta和Serrate，线虫为Lag-2，取首写字母，Notch的配体又被称为DSL蛋白（在哺乳动物中叫做Jagged），都是单次跨膜糖蛋白，其胞外区含有数量不等的EGF样重复区，N端有一个结合Notch体必需的DSL基序。

CSL：为转录因子，在哺乳动物中叫做CBF1，在果蝇中叫做Suppressor of Hairless，在线虫中叫做Lag-1，故名。CSL能识别并结合特定的DNA序列（GTGGGAA），这个序列位于Notch诱导基因的启动子上。ICN不存在时，CSL为转录抑制因子。当结合ICN时，CSL能诱导相关基因的表达。Notch信号的靶基因多为碱性螺旋-环-螺旋类转录因子（basic helix-loop-helix，bHLH），它们又调节其它与细胞分化直接相关的基因的转录。如哺乳动物中的HES（hairy/ enhancer of split）、果蝇中的E（spl）（enhancer of split）及非洲爪蟾中的XHey-1等。

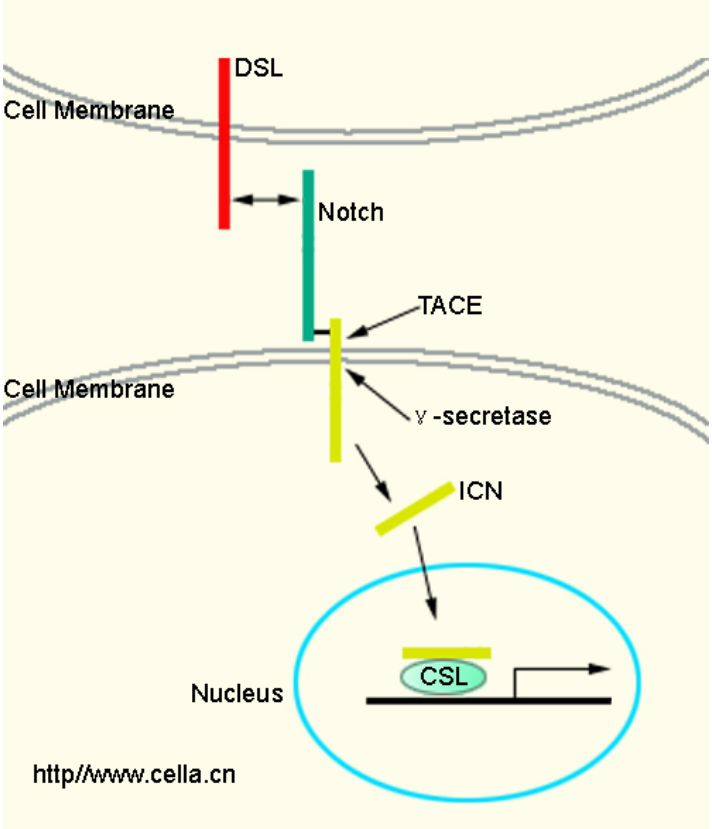


图8-37 Notch信号途径

[21] Nuclear localization signal，一段信号序列，可引导蛋白质进入细胞核。

三、Hedgehog 信号途径

Hedgehog是一种共价结合胆固醇的分泌性蛋白，在动物发育中起重要作用。果蝇的该基因突变导致幼虫体表出现许多刺突，形似刺猬，故名Hedgehog。脊椎动物中至少有3个基因编码Hedgehog蛋白，即：Shh（sonic hedgehog）、Ihh（indian hedgehog）和Dhh（desert hedgehog），其中Shh是根据电子游戏中的角色命名的，后两者是用刺猬的两个种命名的。

两个跨膜蛋白Patched（Ptc）和Smoothened（Smo）介导Hedgehog信号向胞内传递。Ptc是12次跨膜蛋白，能与Hedgehog结合；Smo为7次跨膜蛋白，与G蛋白偶联型受体同源。在无Hedgehog的情况下，Ptc抑制Smo。当Hedgehog与Ptc结合时，则解除了Ptc对Smo的抑制作用，引发下游事件（图8-38）。

Hedgehog信号途径的转录因子是Ci（cubitus interruptus，在脊椎动物中为Gli），具有锌指结构，分子量155KD。在胞质中Ci与其它蛋白形成复合体，这些蛋白包括：Fu（Fused，一种丝氨酸/苏氨酸激酶）、Cos（Costal，一种能将复合体锚定在微管上的蛋白）和Su（suppressor of fused，适配蛋白）。在没有Hedgehog信号时，Ci被水解为75KD的片段，进入细胞核，抑制Hedgehog信号响应基因。当Hedgehog与Ptc结合时，Ci的降解被抑制，从复合体中释放出来，全长的Ci进入细胞核中，启动相关基因表达，这些基因包括Wnt和Ptc。Ptc的表达，又会抑制Smo，从而抑制Hedgehog信号，是一种反馈调节。

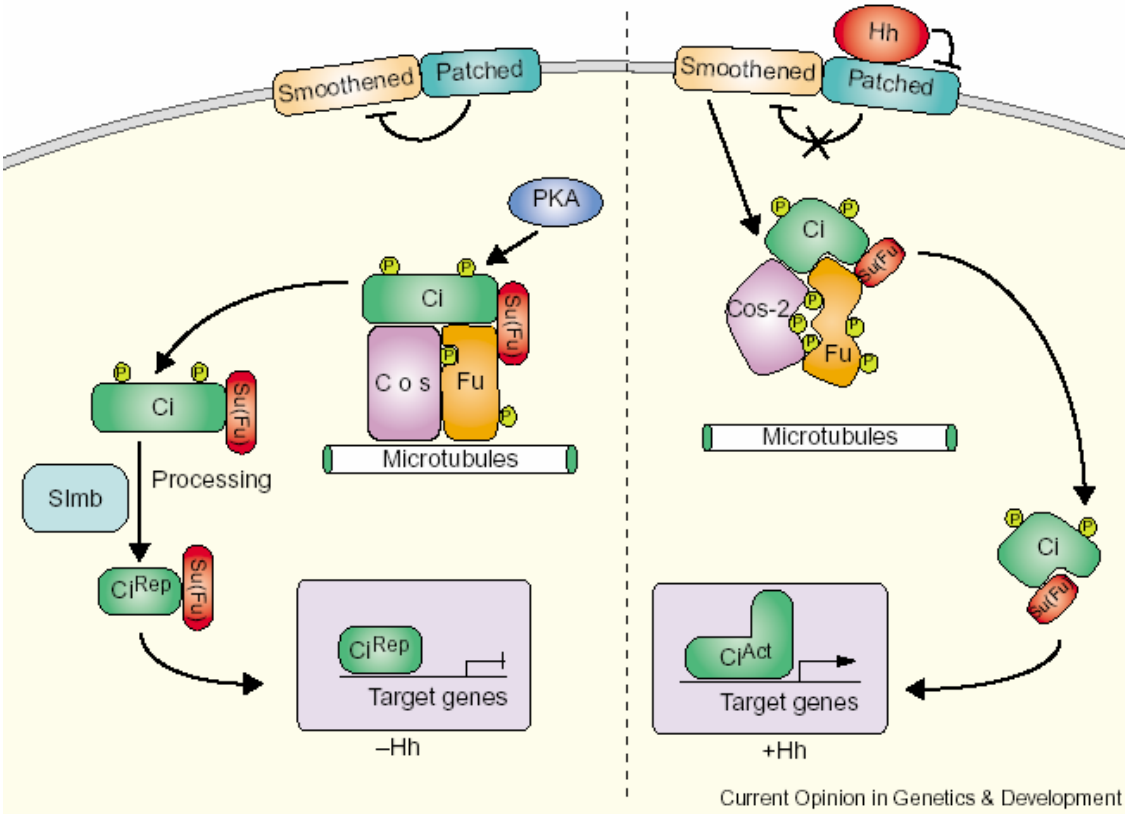


图8-38 Hedgehog信号途径 引自Kent Nybakken、Norbert Perrimon 2002

四、NF-κB 信号途径

NF-κB是属于Rel家族的转录因子，参与调节与机体免疫、炎症反应、细胞分化有关的基因转录。哺乳动物细胞中有五种NF-κB/Rel：RelA(P65)，RelB，C-Rel，NF-κB1(P50)、NF-κB2(P52)，都具有Rel同源区(Rel homology domain，RHD)，能形成同或异二聚体，启动不同的基因转录。静息状态下，NF-κB二聚体与抑制蛋白IκB结合成三聚体而被隐蔽于细胞质，胞外刺激可激活IκB的泛素化降解途径，而使NF–κB二聚体进入胞核，调节基因转录。

IκB家族成员有IκBα，IκBβ，IκBγ，IκBδ，IκBε，Bcl-3等，都具有与Rel蛋白相互作用的锚蛋白重复序列和与降解有关的C端PEST序列。

IKK(IκB kinases)是NF-κB信号传导通路的关键性激酶。胞外信号如：肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor，TNF）、白介素1(interleukin-1，IL-1)等可以激活IKK，使IκB磷酸化，随后被泛素化途径降解。

第九章 细胞骨架

细胞骨架（cytoskeleton）是指真核细胞中的蛋白纤维网络结构。发现较晚，主要是因为一般电镜制样采用低温（0-4℃）固定，而细胞骨架会在低温下解聚。直到 20 世纪 60 年代后，采用戊二醛常温固定，才逐渐认识到细胞骨架的客观存在。

细胞骨架不仅在维持细胞形态，承受外力、保持细胞内部结构的有序性方面起重要作用，而且还参与许多重要的生命活动（图 9-1），如：在细胞分裂中细胞骨架牵引染色体分离，在细胞物质运输中，各类小泡和细胞器可沿着细胞骨架定向转运；在肌肉细胞中，细胞骨架和它的结合蛋白组成动力系统；在白细胞的迁移、精子的游动、神经细胞轴突和树突的伸展等方面都与细胞骨架有关。另外，在植物细胞中细胞骨架指导细胞壁的合成。

细胞骨架由微丝（microfilament）、微管（microtubule）和中间纤维（intemediate filament）构成。微丝确定细胞表面特征，使细胞能够运动和收缩。微管确定膜性细胞器（membrane-enclosed organelle）的位置和作为膜泡运输的导轨。中间纤维使细胞具有张力和抗剪切力。

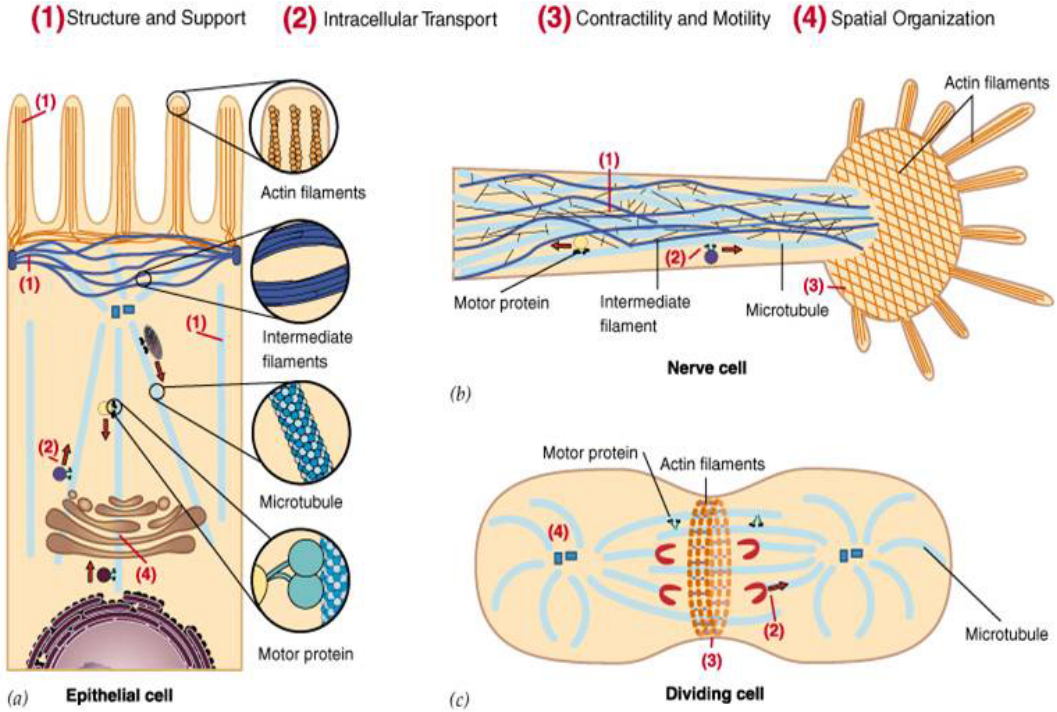


图 9-1 细胞骨架的主要功能（图片来自 G. Karp 2002）

微丝、微管和中间纤维位于细胞质中，又称胞质骨架，它们均由单体蛋白以较弱的非共价键结合在一起，构成纤维型多聚体，很容易进行组装和去组装，这正是实现其功能所必需的特点。

广义的细胞骨架还包括核骨架（nucleoskeleton）、核纤层（nuclear lamina）和细胞外基质（extracellular matrix），形成贯穿于细胞核、细胞质、细胞外的一体

化网络结构。

第一节 微丝

微丝（microfilament，MF）是由肌动蛋白(actin)组成的直径约 7nm 的骨架纤维，又称肌动蛋白纤维 actin filament。微丝和它的结合蛋白（association protion）以及肌球蛋白（myosin）三者构成化学机械系统，利用化学能产生机械运动。

一、分子结构

根据等电点的不同可将高等动物细胞内的肌动蛋白分为 3 类，α 分布于各种肌肉细胞中，β 和 γ 分布于肌细胞和非肌细胞中。

肌动蛋白纤维是由两条线性排列的肌动蛋白链形成的螺旋，状如双线捻成的绳子（图 9-2、3），肌动蛋白的单体为球形分子，称为球形肌动蛋白 G-actin(globular actin)，它的多聚体称为纤维形肌动蛋白 F-actin(fibrous actin)。

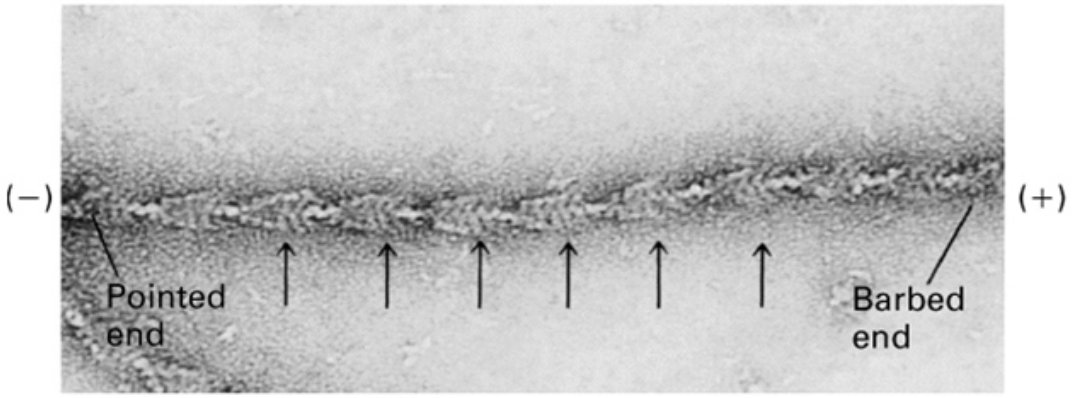


图 9-2 微丝纤维的负染电镜照片

图 9-3 微丝纤维结构模型

肌动蛋白在进化上高度保守，酵母和兔子肌肉的肌动蛋白有 88%的同源性。不同类型肌肉细胞的 α-肌动蛋白分子一级结构（约 400 个氨基酸残基）仅相差 4～6 个氨基酸残基，β-肌动蛋白或 γ-肌动蛋白与 α-横纹肌肌动蛋白相差约 25 个氨基酸残基。

多数简单的真核生物，如酵母或粘菌，含单个肌动蛋白基因，仅合成一种肌动蛋白。真核生物含有多个肌动蛋白基因，如海胆有 11 个，网柄菌属(*Dictyostelium*)有 17 个，在某些植物中有 60 个。肌动蛋白要经过翻译后修饰，如 N-端乙酰化或组氨酸残基的甲基化。

在适宜的温度，存在 ATP、K^+、Mg^{2+}离子的条件下，肌动蛋白单体可自组装为

纤维。

ATP-actin（结合 ATP 的肌动蛋白)对微丝纤维末端的亲和力高，ADP-actin 对纤维末端的亲和力低，容易脱落。当溶液中 ATP-actin 浓度高时，微丝快速生长，在微丝纤维的两端形成 ATP-actin“帽子”，这样的微丝有较高的稳定性。伴随着 ATP 水解，微丝结合的 ATP 就变成了 ADP，当 ADP-actin 暴露出来后，微丝就开始去组装而变短。

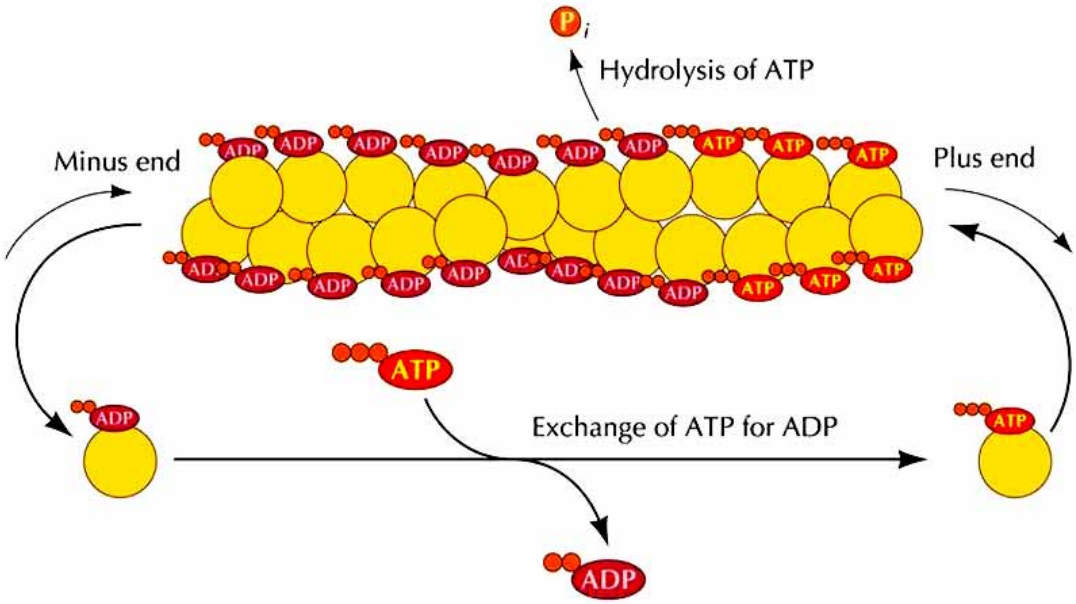


图 9-4 肌动蛋白的踏车行为

微丝具有极性，肌动蛋白单体加到（+）极的速度要比加到（-）极的速度快 5-10 倍。溶液中 ATP-肌动蛋白的浓度也影响组装的速度。当处于临界浓度时，ATP-actin 可能继续在（+）端添加、而在（-）端开始分离，表现出一种“踏车”现象（图 9-4）。

细胞中微丝参与形成的结构除肌原纤维、微绒毛等属于稳定结构外，其他大都处于动态的组装和去组装过程中，并通过这种方式实现其功能。细胞松弛素（cytochalasin）可切断微丝纤维，并结合在微丝末端抑制肌动蛋白加合到微丝纤维上，特异性的抑制微丝功能。鬼笔环肽（phalloidin）与微丝能够特异性的结合，使微丝纤维稳定而抑制其功能。荧光标记的鬼笔环肽可特异性的显示微丝。

二、微丝结合蛋白

已经分离出来的微丝结合蛋白有 100 多种，可分为以下不同类型（图 9-5）：

1．核化蛋白（nucleating protein）

核化（nucleation）是纤维组装的第一步，即几个蛋白单体先组装成多聚体，然后其它单体继续添加形成长纤维分子。Arp（actin-related protein）复合体在体内和体外都可以促进肌动蛋白的核化，其作用就像一个模板，类似于微管组织中心的 γ 球蛋白复合体，Arp 复合体由 Arp2、Arp3 和 5 种其它蛋白构成。Arp 与 actin 在结构上具有同源性。

2．单体隐蔽蛋白（monomer sequestering protein）

细胞中约有 50%的肌动蛋白为可溶性肌动蛋白，大大高于肌动蛋白组装所需的临界浓度。但是这些蛋白与其它蛋白结合，构成一个隐蔽的蛋白库。只有当细胞需要组装纤维的时候这些可溶性肌动蛋白才被释放出来。如：thymosin 与 actin 结合可阻止其向纤维添加，抑制其水解或交换结合的核苷酸。

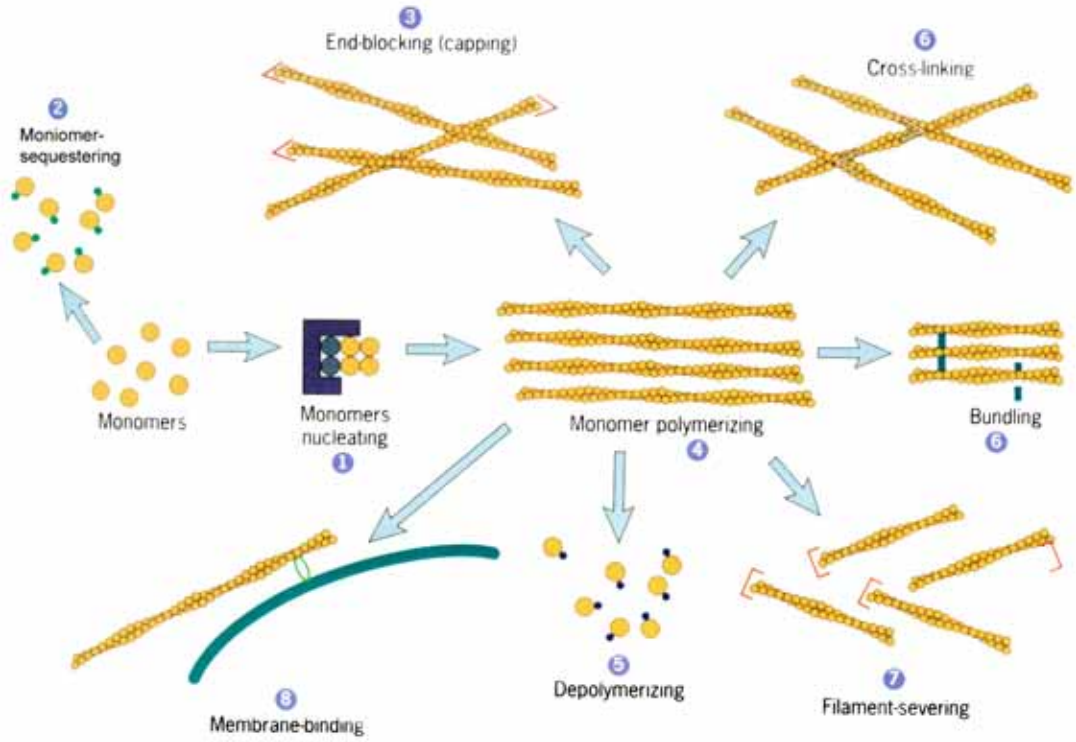


图 9-5 各类微管结合蛋白（图片来自 G. Karp 2002）

3．封端蛋白（end-blocking protein）

作用是调节肌动蛋白纤维的长度，结合在（+）或（-）极形成“帽子”，阻止其它单体添加。如骨骼肌细肌丝的（-）端被 tropomodulin 封闭，（+）端被 CapZ 封闭。

4．单体聚合蛋白（monomer polymerizing protein）

如 profilin 结合在 actin 的 ATP 结合位点相对的一侧，能与 thymosin 竞争结合 actin，profilin 可将结合的单体安装到纤维的（+）极。

5．微丝解聚蛋白（actin-filament depolymerizing protein）

如 cofilin 可结合在纤维的 （-）极，使微丝去组装。这种蛋白在微管快速组装和去组装的结构中具有重要的作用，涉及细胞的移动、内吞和胞质分裂。

6．交联蛋白(cross-linking protein)

每一种蛋白含有 2 至多个微丝结合部位，因此可以将 2 至多条纤维联系在一起形成纤维束或网络。分为成束蛋白和成胶蛋白两类，成束蛋白如：丝束蛋白（fimbrin）、绒毛蛋白（villin）和 α-辅肌动蛋白（α-actinin），可以将肌动蛋白纤丝交联成平行排列成束的结构。成胶蛋白，如细丝蛋白（filamin）促使形成肌动蛋白微丝网。

7．纤维切断蛋白（filament severing protein）

此类蛋白能结合在微丝中部，将微丝切断。如溶胶蛋白（gelsolin）。

8．膜结合蛋白（membrane-binding protein）

如粘着斑蛋白（vinculin）可将肌动蛋白纤维连接在膜上，参与构成粘合带。

三、肌肉的组成

肌肉由肌原纤维组成，肌原纤维由粗肌丝和细肌丝组成，粗肌丝的主要成分是肌球蛋白，而细肌丝的主要成分是肌动蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白。关于肌小节的构造（图 9-6、7）请参阅生理学或组织学书籍。

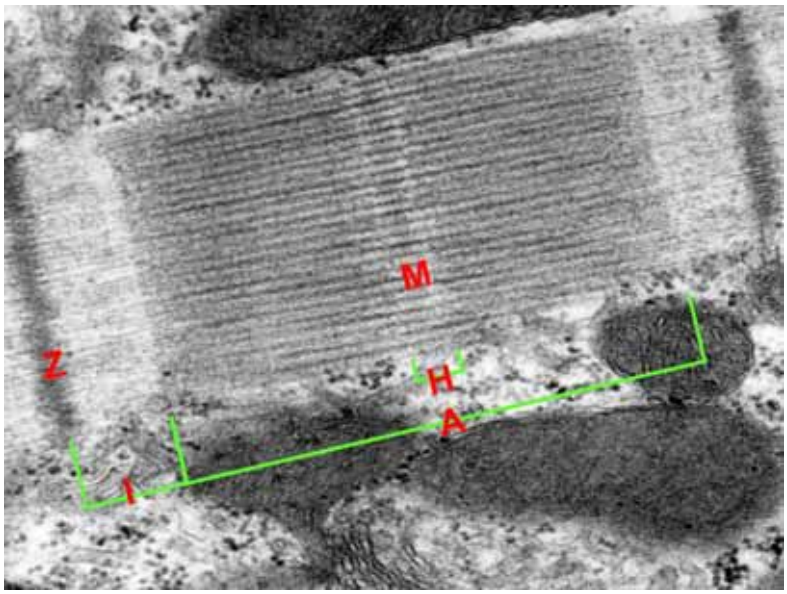


图 9-6 肌纤维 TEM 照片

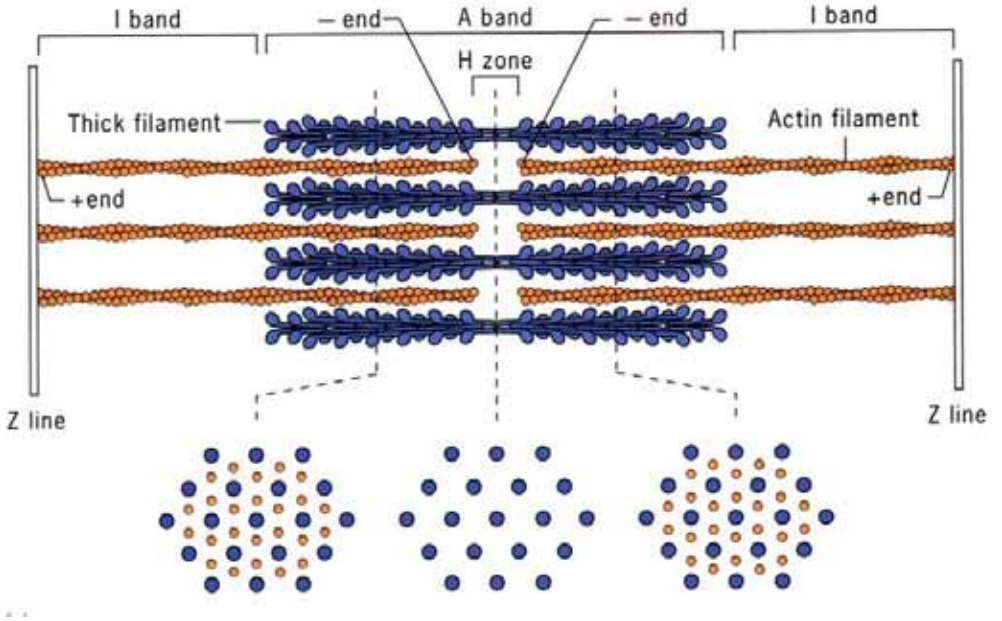


图 9-7 肌小节模式图

（一）肌球蛋白（myosin）

属于马达蛋白，可利用 ATP 产生机械能，趋向微丝的（+）极运动（图 9-8），最早发现于肌肉组织(myosin II)，1970s 后逐渐发现许多非肌细胞的 myosin，目前已知的有 15 种类型（myosin I-XV）。

Myosin II 是构成肌纤维的主要成分之一。由两个重链和 4 个轻链组成，重链形成一个双股 α 螺旋，一半呈杆状，另一半与轻链一起折叠成两个球形区域，位于分子一端，球形的头部具有 ATP 酶活性(图 9-9)。

Myosin V 结构类是于 myosin II，但重链有球形尾部。

Myosin I 由一个重链和两个轻链组成。

Myosin I、II、V 都存在于非肌细胞中，II 型参与形成应力纤维和胞质收缩环，I、V 型结合在膜上与膜泡运输有关 ，神经细胞富含 myosin V 。

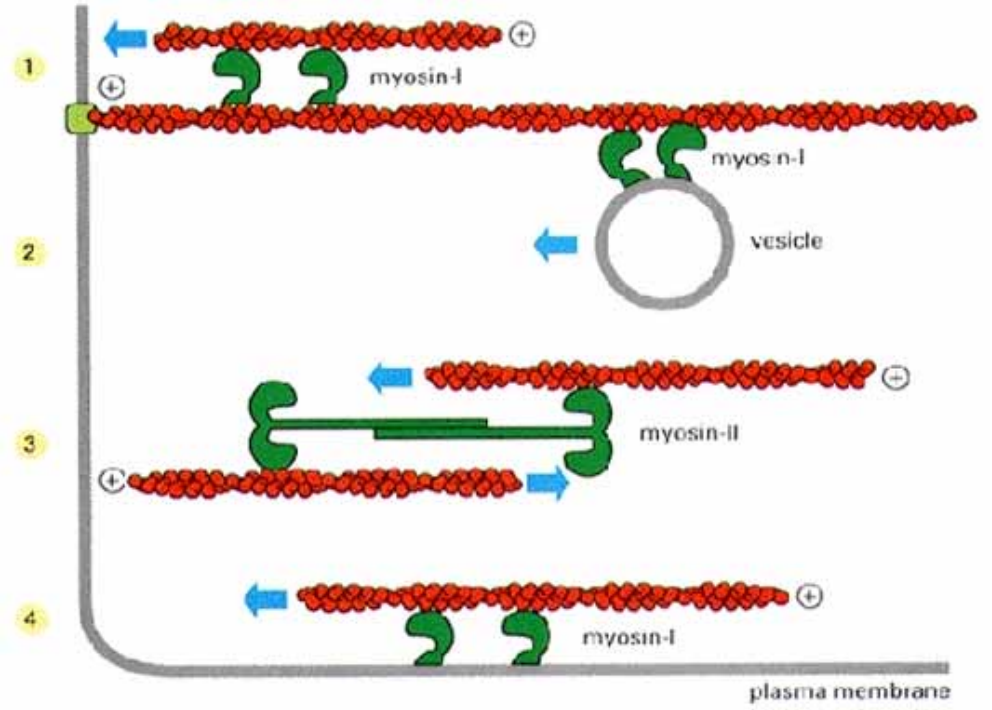


图 9-8 myosin II 的功能

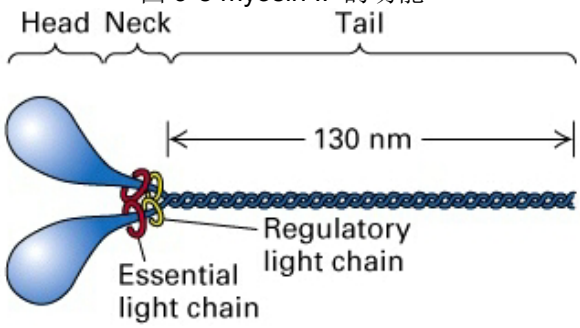


图 9-9 myosin II 结构模型

（二）原肌球蛋白

原肌球蛋白（tropomyosin.Tm）分子量 64KD，是由两条平行的多肽链扭成螺旋，每个 Tm 的长度相当于 7 个肌动蛋白，呈长杆状。原肌球蛋白与肌动蛋白结合，位于肌动蛋白双螺旋的沟中，主要作用是加强和稳定肌动蛋白丝，抑制肌动蛋白与肌球蛋白结合（图 9-10）。

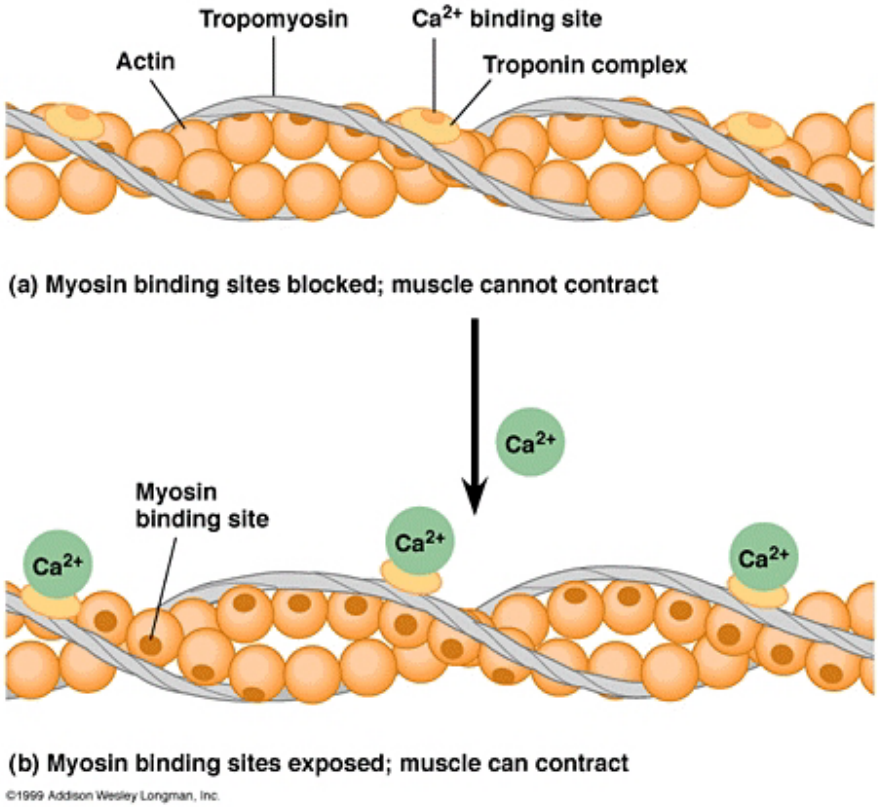


图 9-10 细肌丝的组成

（三）肌钙蛋白

肌钙蛋白（troponin,Tn），分子量 80KD，含三个亚基，肌钙蛋白 C 特异地与钙结合，肌钙蛋白 T 与原肌球蛋白有高度亲和力，肌钙蛋白 I 抑制肌球蛋白的 ATP 酶活性，细肌丝中每隔 40nm 就有一个肌钙蛋白复合体（图 9-8）。

（四）肌肉的收缩

肌细胞上的动作电位引起肌质网 Ca^{2+}电位门通道开启，肌浆中 Ca^{2+}浓度升高，肌钙蛋白与 Ca^{2+}结合，引发原肌球蛋白构象改变，暴露出肌动蛋白与肌球蛋白的结

合位点（图 9-8）。肌动蛋白通过结合与水解 ATP、不断发生周期性的构象改变、引起粗肌丝和细肌丝的相对滑动。肌动蛋白的工作原理可概括如下：

①肌球蛋白结合 ATP，引起头部与肌动蛋白纤维分离；②ATP 水解，引起头部与肌动蛋白弱结合；③Pi 释放，头部与肌动蛋白强结合，头部向 M 线方向弯曲（微丝的负极），引起细肌丝向 M 线移动；④ADP 释放 ATP 结合上去，头部与肌动蛋白纤维分离。如此循环（图 9-11）。

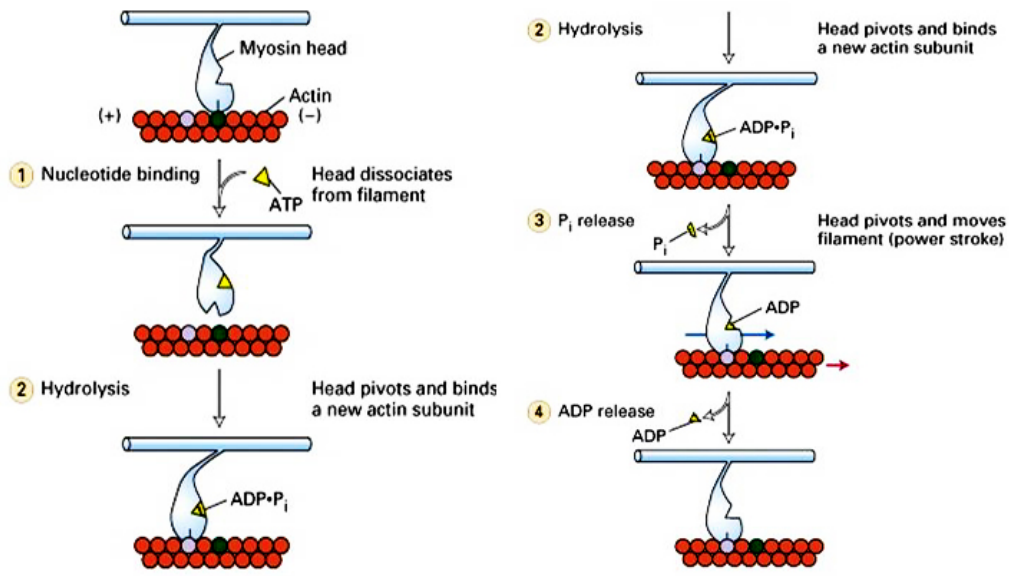


图 9-11 肌肉收缩图解

四、微丝的功能

微丝除参与形成肌原纤维外还具有以下功能：

1．形成应力纤维（stress fiber）：非肌细胞中的应力纤维与肌原纤维有很多类似之处：都包含 myosin II、原肌球蛋白、filamin 和 α -actinin。培养的成纤维细胞中具有丰富的应力纤维，并通过粘着斑固定在基质上。在体内应力纤维使细胞具有抗剪切力(图 9-12、13)。

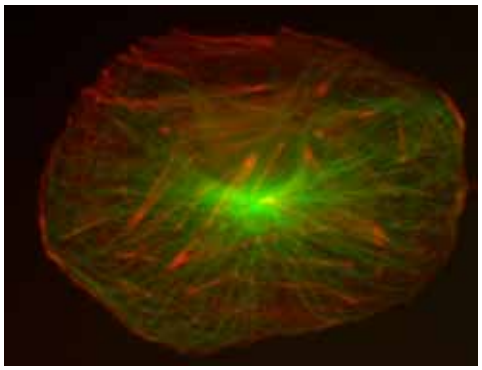


图 9-12 培养的上皮细胞中的应力纤维（微丝红色、微管绿色）（图片来自 http://www.itg.uiuc.edu/）

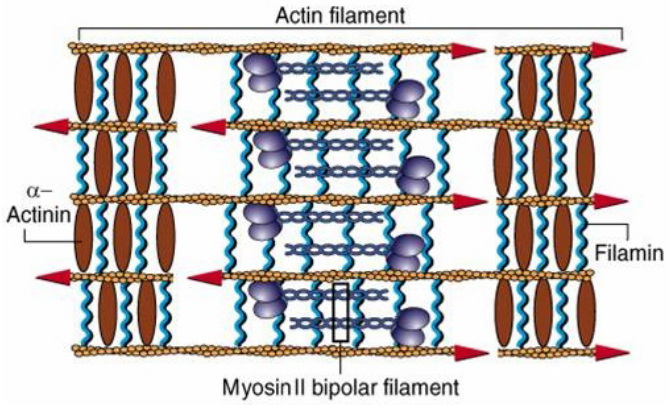


图 9-13 应力纤维结构模型（图片来自 G. Karp 2002）

2．形成微绒毛：参见第四章。

3．细胞的变形运动：分为四步：①：微丝纤维生长，使细胞表面突出，形成片足(lamellipodium)；②在片足与基质接触的位置形成粘着斑；③在 myosin 的作用下微丝纤维滑动，使细胞主体前移；④解除细胞后方的粘和点。如此不断循环，细胞向前移动(图 9-14)。阿米巴原虫、白细胞、成纤维细胞都能以这种方式运动。

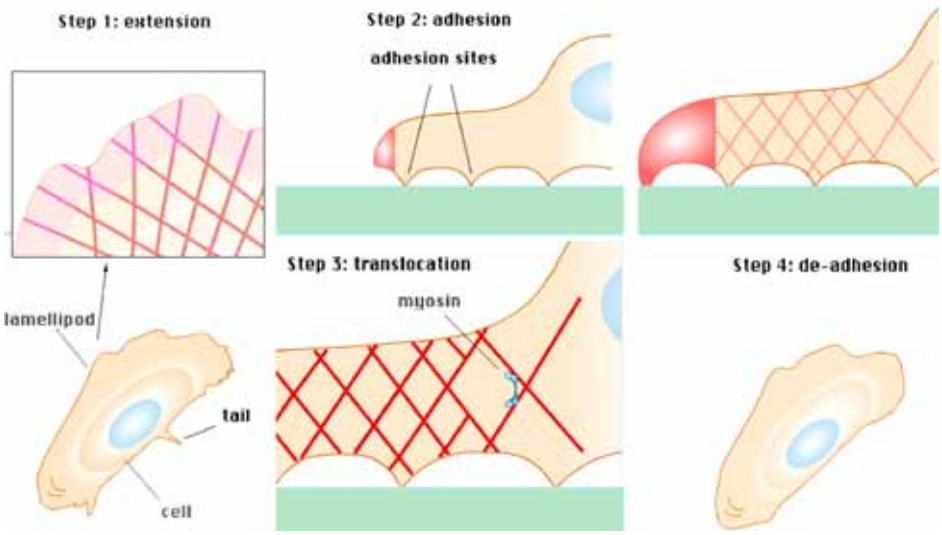


图 9-14 细胞的变形运动(根据 Molecular Biology of the Cell 4th 书末动画改编)

4．胞质分裂：有丝分裂末期，两个即将分离的子细胞内产生收缩环，收缩环由平行排列的微丝和 myosin II 组成。随着收缩环的收缩，两个子细胞的胞质分离，在细胞松弛素存在的情况下，不能形成胞质分裂环，因此形成双核细胞。

5．顶体反应：在精卵结合时，微丝使顶体突出，穿入卵子的胶质里，融合后受精卵细胞表面积增大，形成微绒毛，微丝参与形成微绒毛，有利于吸收营养。

6．其他功能：如细胞器运动、质膜的流动性、胞质环流均与微丝的活动有关，抑制微丝的药物（细胞松弛素）可增强膜的流动、破坏胞质环流。

第二节 微管

微管在胞质中形成网络结构，作为运输路轨并起支撑作用。微管是由微管蛋白组成的管状结构，对低温、高压和秋水仙素敏感。

一、分子结构

微管是由 13 条原纤维（protofilament）构成的中空管状结构（图 9-15），直径 22~25nm。每一条原纤维由微管蛋白二聚体线性排列而成。微管蛋白二聚体由结构相似的 α 和 β 球蛋白构成，两种亚基均可结合 GTP，α 球蛋白结合的 GTP 从不发生水解或交换，是 α 球蛋白的固有组成部分，β 球蛋白结合的 GTP 可发生水解，结合的 GDP 可交换为 GTP，可见 β 亚基也是一种 G 蛋白（图 9-16）。

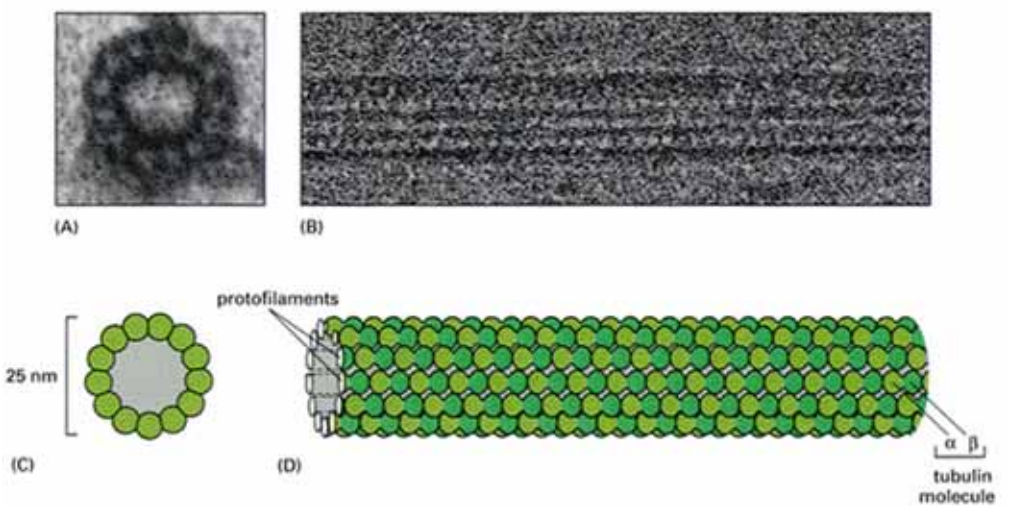


图 9-15 微管纤维

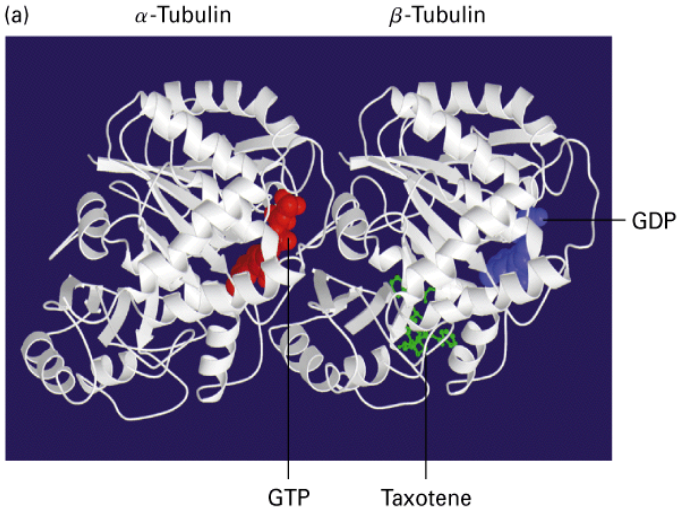


图 9-16 微管蛋白分子模型

微管具有极性，（+）极(plus end)生长速度快，（-）极(minus end)生长速度慢，也就是说微管蛋白在（+）极的添加速度高于-极。（+）极的最外端是β球蛋白，（-）极的最外端是α球蛋白。微管和微丝一样具有踏车行为。

微管形成的有些结构是比较稳定的，是由于微管结合蛋白的作用和酶修饰的原因。如神经细胞轴突、纤毛和鞭毛中的微管纤维。大多数微管纤维处于动态的组装和去组装状态，这是实现其功能所必需的过程（如纺锤体）。秋水仙素(colchicine)结合的微管蛋白可加合到微管上，但阻止其他微管蛋白单体继续添加，从而破坏纺锤体结构，长春花碱具有类似的功能。紫杉酚(taxol)，能促进微管的装配，并使已形成的微管稳定。但这种稳定性会破坏微管的正常功能。以上药物均可以阻止细胞分裂，可用于癌症的治疗。

二、微管结合蛋白

微管结合蛋白（microtubule associated proteins MAPs）分子至少包含一个结合微管的结构域和一个向外突出的结构域。突出部位伸到微管外与其它细胞组分（如微管束、中间纤维、质膜）结合（图 9-17）。

MAP 的主要功能是：①促进微管聚集成束；②增加微管稳定性或强度；③促进微管组装。包括 I 型和 II 型两大类， I 型对热敏感，如 MAP1a、 MAP1b，主要存在于神经细胞 。II 型热稳定性高，包括 MAP2a、b、c, MAP4 和 tau 蛋白。其中 MAP2 只存在于神经细胞，MAP2a 的含量减少影响树突的生长。

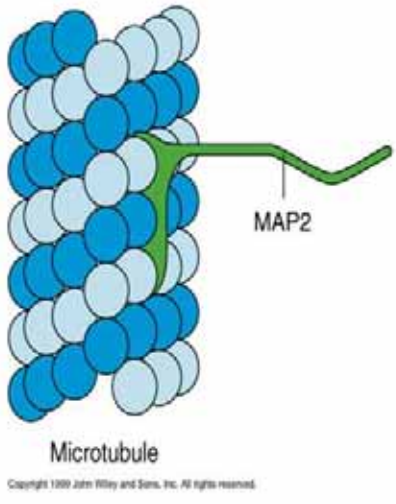


图 9-17 MAP2

三、微管组织中心

微管组织中心（microtubule organizing center MTOCs）是微管进行组装的区域，中心体、基体均具有微管组织中心的功能。所有微管组织中心都具有γ微管球蛋白，这种球蛋白的含量很低，可聚合成环状复合体，像模板一样参与微管蛋白的核化，帮助α和β球蛋白聚合为微管纤维。

中心体（centrosome）位于细胞的中心部位（图 9-18），由两个相互垂直的中心粒（centriole）构成（图 9-19）。周围是一些无定形或纤维形、高电子密度的物质，叫做外中心粒物质（PCM，pericentriolar material）。中心粒直径 0.2mm，长 0.4mm，由 9 组 3 联微管构成，不直接参与微管蛋白的核化，具有召集 PCM 的作用。

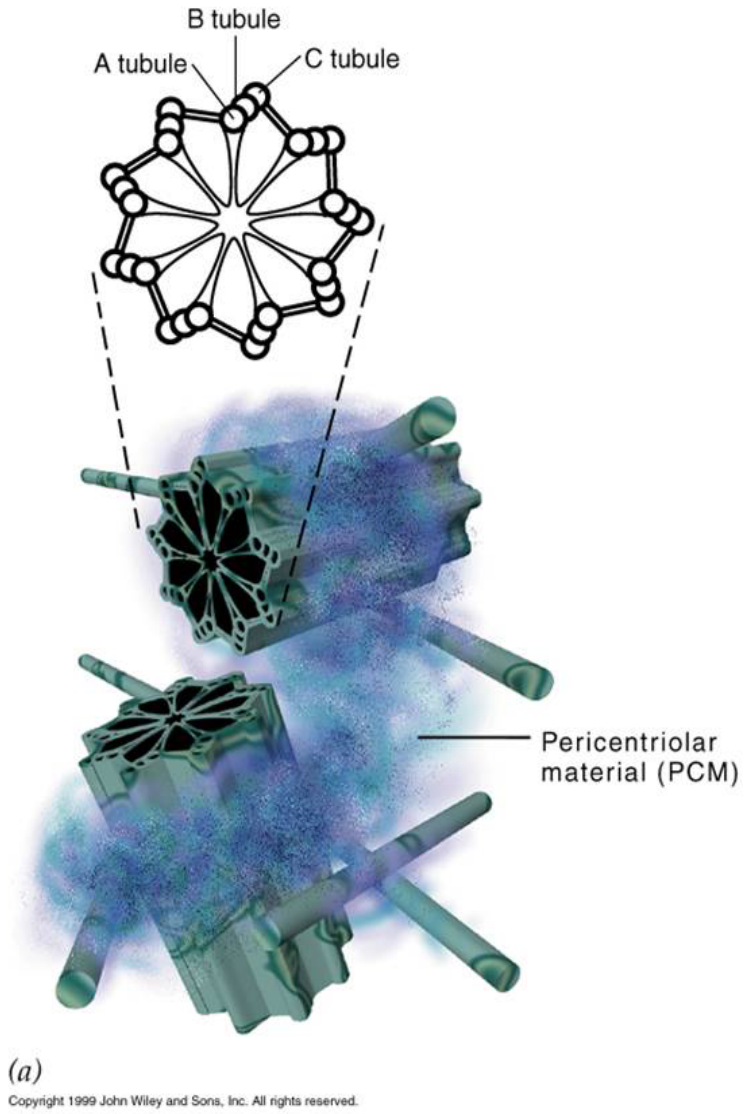


图 9-18 中心体结构模型

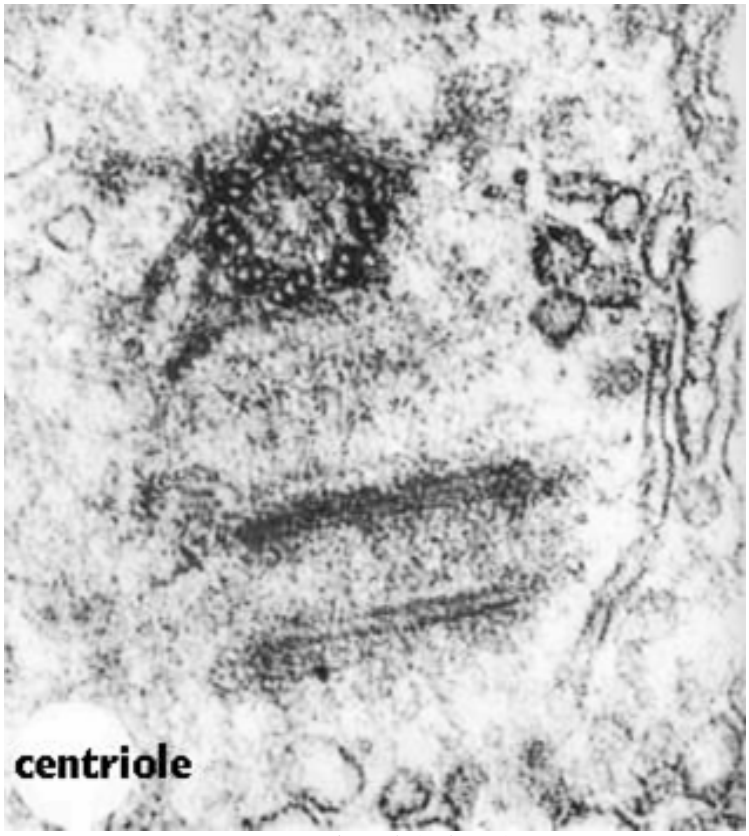


图 9-19 中心粒电镜照片

微管蛋白以环状的γ球蛋白复合体为模板核化、先组装出（-）极，然后开始生长，因此中心体周围的微管（-）极指向中心体，（+）级远离中心体。

1972 年 R. Weisenberg 证明提纯的微管，在微酸性环境（PH=6.9），适宜的温度下，存在 GTP、Mg^{2+}和去除 Ca^{2+}的条件下能自发的组装成微管。但这种微管只有 11 条原纤维，可能是因为没有γ微管球蛋白构成的模板。

微管β球蛋白结合的 GTP 水解并不是微管组装所必需的步骤，但是结合 GTP 的微管蛋白二聚体能加合到微管纤维上，在快速生长的纤维两端微管球蛋白结合的 GTP 来不及水解，形成的“帽子”，使微管纤维较为稳定。一旦暴露出结合 GDP 的亚单位微管，则开始去组装。

四、微管的功能

1、支架作用

细胞中的微管就像混凝土中的钢筋一样，起支撑作用，在培养的细胞中，微管呈放射状排列在核外，（+）端指向质膜（图 9-20），形成平贴在培养皿上的形状。在神经细胞的轴突和树突中，微管束沿长轴排列，起支撑作用，在胚胎发育阶段为管帮助轴突生长，突入周围组织，在成熟的轴突中，微管是物质运输的路轨。

图 9-20 细胞和外放射状排列的微管纤维（红色）图片来自 http://www.itg.uiuc.edu/

2、细胞内运输

微管起细胞内物质运输的路轨作用，破坏微管会抑制细胞内的物质运输。

与微管结合而起运输作用的马达蛋白有两大类：驱动蛋白 kinesin，动力蛋白 dyenin，两者均需 ATP 提供能量。

Kinesin 发现于 1985 年，是由两条轻链和两条重链构成的四聚体（图 9-21），外观具有两个球形的头（具有 ATP 酶活性）、一个螺旋状的杆和两个扇子状的尾。通过结合和水解 ATP，导致颈部发生构象改变，使两个头部交替与微管结合，从而沿微管“行走”，将“尾部”结合的“货物”（运输泡或细胞器）转运到其它地方。据估计哺乳动物中类似于 kinesin 的蛋白（KLP, kinesin-like protein or KRB, kinesin-related protein）超过 50 余种，大多数 KLP 能向着微管（+）极运输小泡，也有些如 Ncd 蛋白（一种着丝点相关的蛋白）趋向微管的（-）极。

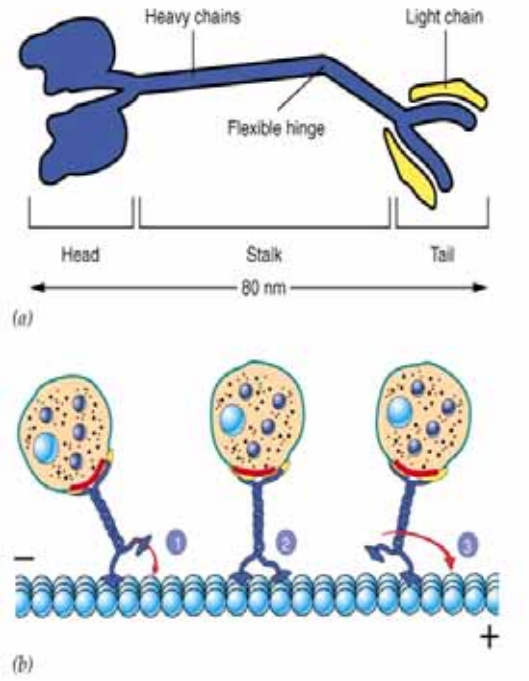


图 9-21 Kinesin

Dynein 发现于 1963 年，因与鞭毛和纤毛的运动有关而得名。dynein 分子量巨大（接近 1.5Md），由两条相同的重链和一些种类繁多的轻链以及结合蛋白构成（鞭毛二联微管外臂的动力蛋白具有三个重链）。其作用主要有以下几个方面：在细胞分裂中推动染色体的分离、驱动鞭毛的运动、向着微管（-）极运输小泡（图 9-22）。

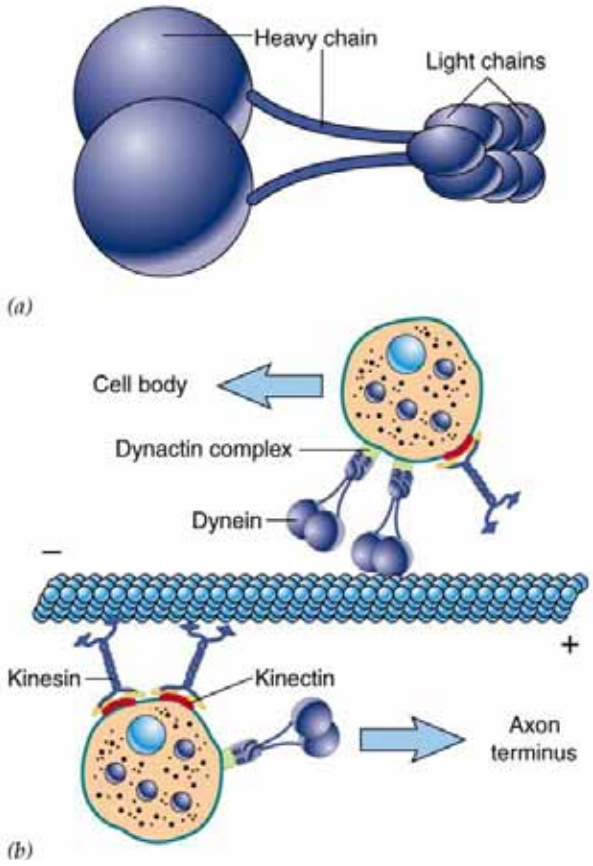


图 9-22 Dynein （图片来自 G. Karp 2002）

3、形成纺锤体

纺锤体是一种微管构成的动态结构，其作用是在分裂细胞中牵引染色体到达分裂极，详细内容参见第十三章。

4、纤毛与鞭毛的运动

纤毛与鞭毛是相似的两种细胞外长物，前者较短，约 5~10um；后者较长，约 150um，两者直径相似，均为 0.15~0.3um。

鞭毛和纤毛均由基体和鞭杆两部分构成（图 9-23），鞭毛中的微管为 9+2 结构，即由 9 个二联微管和一对中央微管构成，其中二联微管由 AB 两个管组成，A 管由 13 条白纤维组成，B 管由 10 条白纤维组成，两者共用三条。A 管对着相邻的 B 管伸出两条动力蛋白臂（图 9-24），并向鞭毛中央发生一条辐。基体的微管组成为 9+0，并且二联微管为三联微管所取代，结构类似于中心粒。

纤毛和鞭毛的运动是依靠动力蛋白（dynein）水解 ATP，使相邻的二联微管相互滑动。有一种男性不育症是由于精子没有活力造成的。这种病人同时还患有慢性支气管炎，主要是因为是鞭毛和纤毛没有动力蛋白臂，不能排出侵入肺部的粒子。

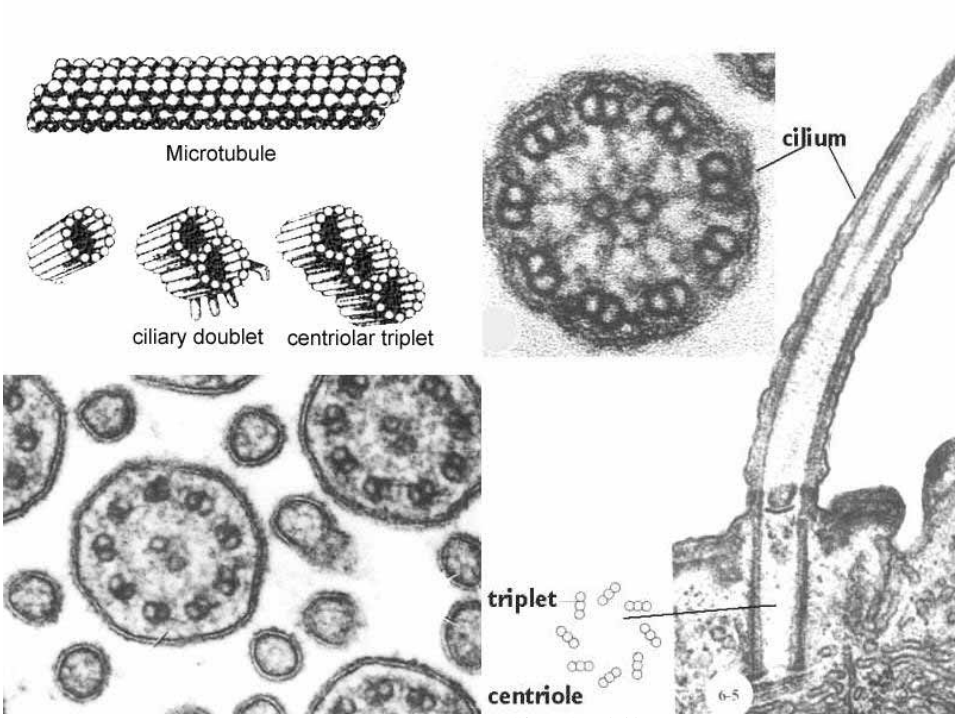


图 9-23 鞭毛的结构

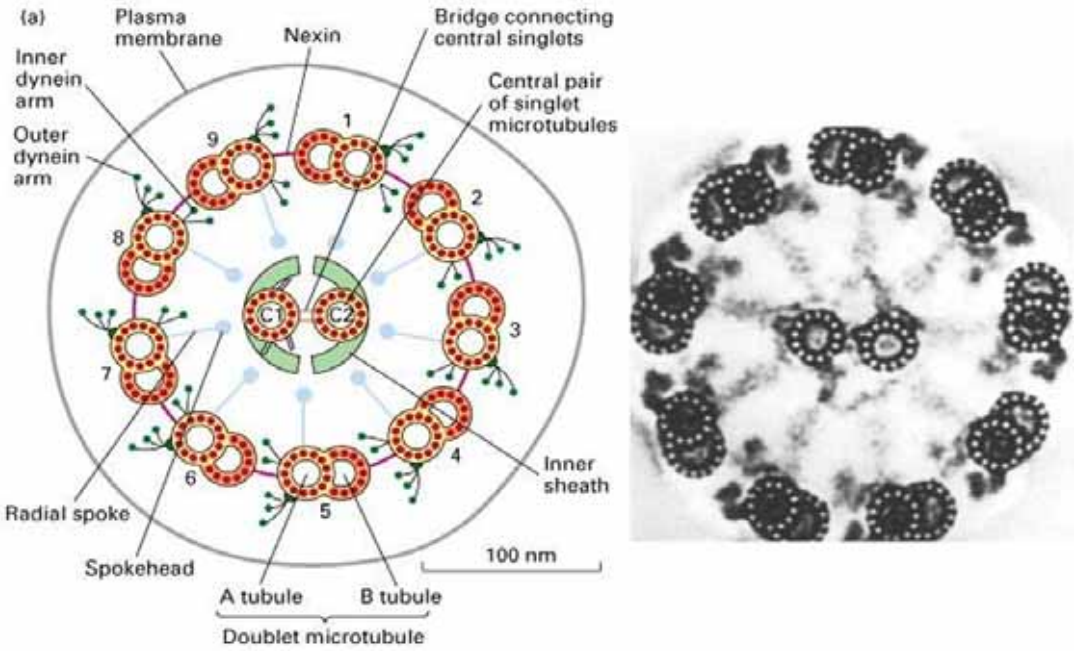


图 9-24 鞭毛轴丝结构

第三节 中间纤维

中间纤维（intermediate filaments，IF）直径 10nm 左右，介于微丝和微管之间。与微管不同的是中间纤维是最稳定的细胞骨架成分，它主要起支撑作用。中间纤维在细胞中围绕着细胞核分布，成束成网，并扩展到细胞质膜，与质膜相连结。

一、类型

IF 是一类形态上非常相似，而化学组成上有明显差异的蛋白质，成分比微丝和微管都复杂，可根据组织来源的免疫原性分为 5 类(图 9-25)：角蛋白（keratin）、结蛋白（desmin）、胶质原纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein）、波形纤维蛋白（vimentin）、神经纤丝蛋白(neurofilament protein)，此外细胞核中的核纤肽（lamin）也是一种中间纤维。

中间纤维具有组织特异性，不同类型细胞含有不同 IF 蛋白质。肿瘤细胞转移后仍保留源细胞的 IF，因此可用 IF 抗体来鉴定肿瘤的来源。如乳腺癌和胃肠道癌，含有角蛋白，因此可断定它来源于上皮组织。大多数细胞中含有一种中间纤维，但也有少数细胞含有 2 种以上，如骨骼肌细胞含有结蛋白和波形蛋白。

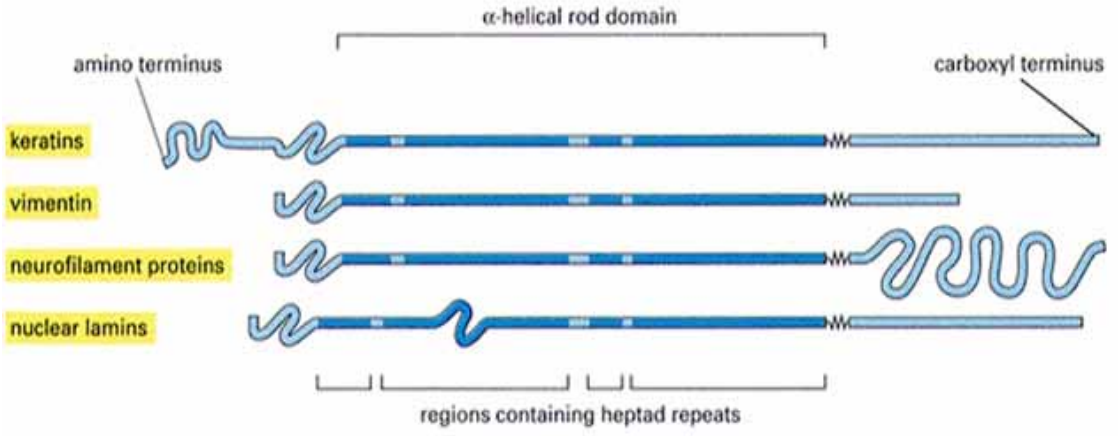


图 9-25 几种中间纤维的模式图

（一）角蛋白

分子量约 40~70KD，出现在表皮细胞中，在人类上皮细胞中有 20 多种不同的角蛋白，分为 α 和 β 两类。β 角蛋白又称胞质角蛋白（cyto-keratin），分布于体表、体腔的上皮细胞中。α 角蛋白为头发、指甲等坚韧结构所具有。

根据组成氨基酸的不同，亦可将角蛋白分为：酸性角蛋白（I 型）和中性或碱性角蛋白（II 型），角蛋白组装时必须由 I 型和 II 型以 1：1 的比例混合组成异二聚体，才能进一步形成中间纤维。

（二）结蛋白

又称骨骼蛋白 skeletin，分子量约 52KD，存在于肌肉细胞中，它的主要功能是使肌纤维连在一起。

（三）胶质原纤维酸性蛋白

又称胶质原纤维 glial filament，分子量约 50KD，存在于星形神经胶质细胞和周围神经的许旺细胞。它主要起支撑作用。

（四）波形纤维蛋白

分子量约 53KD，广泛存在于间充质细胞及中胚层来源的细胞中，波形蛋白一端与核膜相连，另一端与细胞表面处的桥粒或半桥粒相连，将细胞核和细胞器维持在特定的空间。

（五）神经纤丝蛋白

是由三种分子量不同的多肽组成的异聚体，三种多肽是 NF-L（**low**，60~70KD），NF-M（**medium** ，105~110KD），NF-H（**heavy**， 135-150KD）神经纤丝蛋白的功能是提供弹性使神经纤维易于伸展和防止断裂。

二、结构

中间纤维蛋白分子由一个 310 个氨基酸残基形成的 α 螺旋杆状区，以及两端非螺旋化的球形头（N 端）尾（C 端）部构成。

杆状区是高度保守的，由螺旋 1 和螺旋 2 构成，每个螺旋区还分为 A、B 两个亚区，它们之间由非螺旋式的连结区连结在一起（图 9-26）。

头部和尾部的氨基序列在不同类型的中间纤维中变化较大，可进一步分为①H 亚区：同源区；②V 亚区：可变区；③E 亚区：末端区。

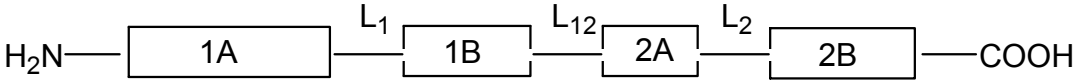


图 9-26 中间纤维的通用结构图

IF 的装配过程与 MT、MF 相比较为复杂。根据 X 衍射，电镜观察和体外装配的实验结果推测，中间纤维的装配过程如下（图 9-27）：

①两个单体，形成两股超螺旋二聚体（角蛋白为异二聚体）；

②两个二聚体反向平行组装成四聚体，三个四聚体长向连成原丝；

③两个原丝组成原纤维；
④4 根原纤维组成中间纤维。

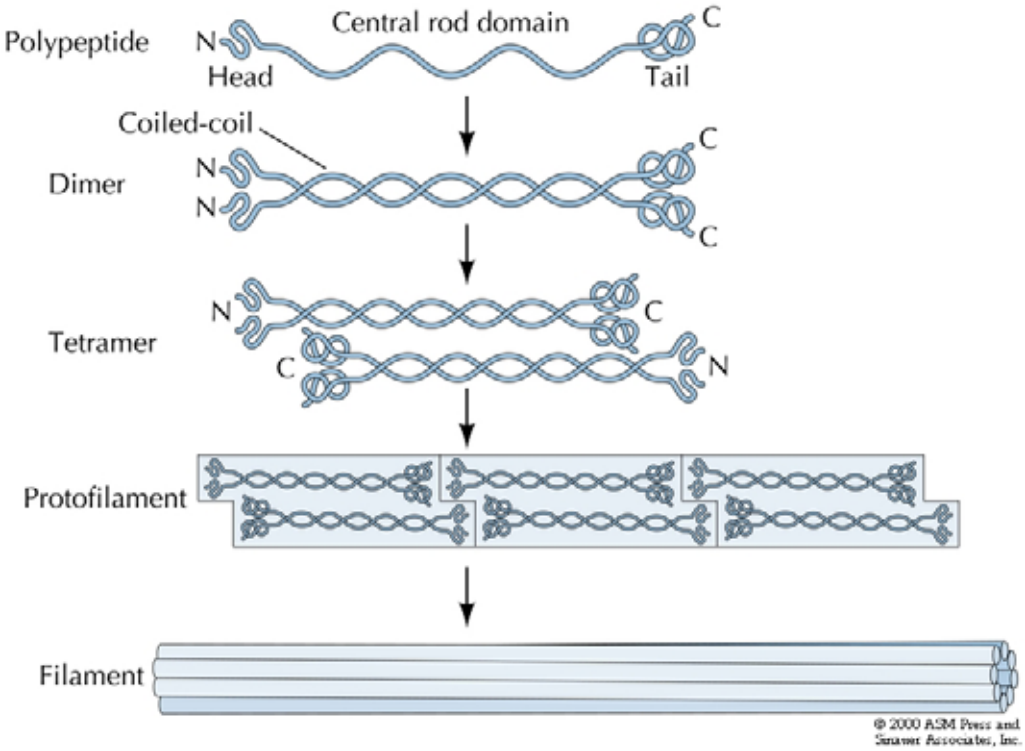


图 9-27 中间纤维的组装

由于 IF 是由反向平行的 α 螺旋组成的，所以和微丝微管不同的是，它没有极性。另外，细胞内的中间纤维蛋白绝大部分组装成中间纤维，而不象微丝和微管哪样存在蛋白库，仅约 50%左右的处于装配状态。再者 IF 的装配与温度和蛋白浓度无关，不需要 ATP 或 GTP。

三、IF 的结合蛋白

中间纤维的结合蛋白（intermediate filament associated protein，IFAP）的功能是使中间纤维交联成束、成网，并把中间纤维交联到质膜或其它骨架成分上，已知的 IFAPs 约 15 种左右，分别与特定的中间纤维结合，如：

flanggrin 使角蛋白交联成束。

Plectin 将波形蛋白纤维与微管交联在一起。

Ankyrin 把结蛋白纤维与质膜连在一起。

IFAPs 的共同特点是：①具有中间纤维特异性。②表达有细胞专一性。③不同的 IFAP 可存在于同一细胞中与不同的中间纤维组织状态相联系。④在细胞中某些 IFAP 的表达与细胞的功能和发育状态有关。

表 1. 胞质骨架三种组分的比较

	微丝	微管	中间纤维
单体	球蛋白	αβ 球蛋白	杆状蛋白
结合核苷酸	ATP	GTP	无
纤维直径	~7nm	~25nm	10nm
结构	双链螺旋	13 根源纤丝组成空心管状纤维	4 个 8 聚体组成的空心管状纤维
极性	有	有	无
组织特异性	无	无	有
蛋白库	有	有	无
踏车形为	有	有	无
动力结合蛋白	肌球蛋白	动力蛋白，驱动蛋白	无
特异性药物	细胞松驰素 鬼笔环肽	秋水仙素，长春花碱，紫杉酚	

第十章　细胞外基质

细胞外基质（extracellular matrix，ECM）是由大分子构成的错综复杂的网络。为细胞的生存及活动提供适宜的场所，并通过信号转导系统影响细胞的形状、代谢、功能、迁移、增殖和分化。

第一节 细胞外基质的大分子组成成分

构成细胞外基质的大分子种类繁多，可大致归纳为四大类：胶原、非胶原糖蛋白、氨基聚糖与蛋白聚糖、以及弹性蛋白（图 10-1，2）。

上皮组织、肌组织及脑与脊髓中的 ECM 含量较少，而结缔组织中 ECM 含量较高。细胞外基质的组分及组装形式由所产生的细胞决定，并与组织的特殊功能需要相适应。例如，角膜的细胞外基质为透明柔软的片层，肌腱的则坚韧如绳索。细胞外基质不仅静态的发挥支持、连接、保水、保护等物理作用，而且动态的对细胞产生全方位影响。

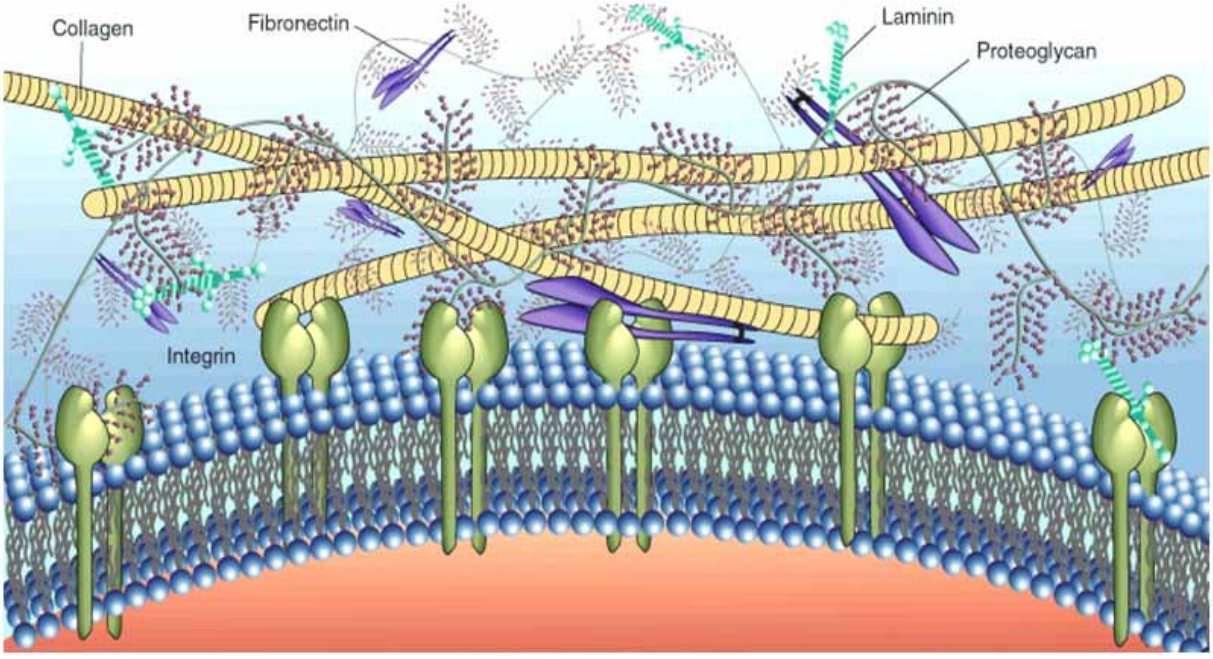


图 10-1 细胞外基质的成分

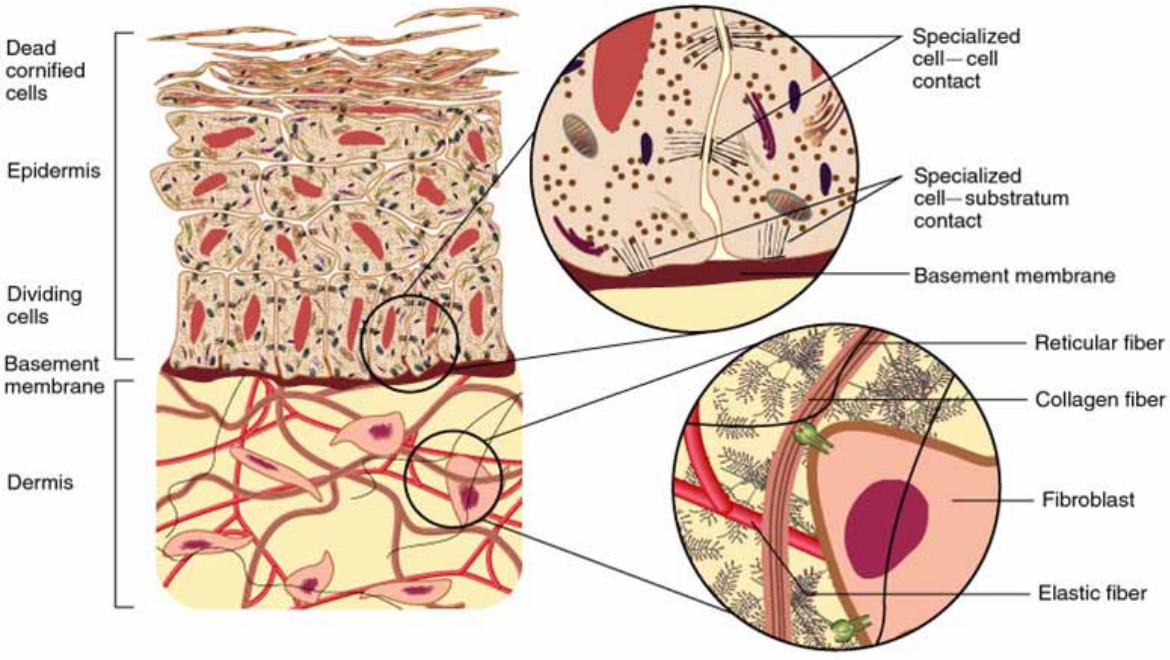


图 10-2 上皮组织的细胞外基质

一、胶原（collagen）

胶原是动物体内含量最丰富的蛋白质，约占人体蛋白质总量的 30%以上。它遍布于体内各种器官和组织，是细胞外基质中的框架结构，可由成纤维细胞（图 10-3）、软骨细胞、成骨细胞及某些上皮细胞合成并分泌到细胞外。

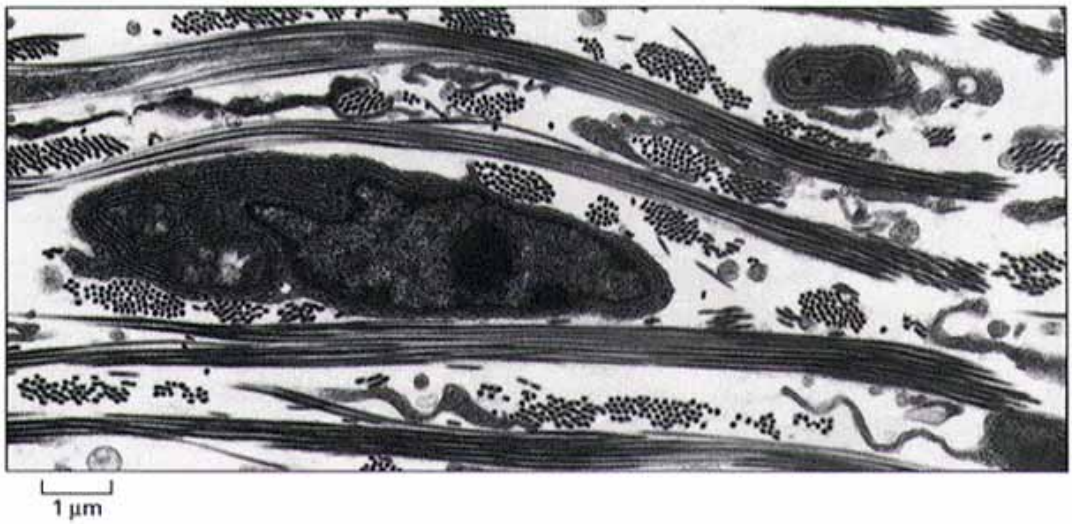


图 10-3 成纤维细胞周围的胶原纤维

目前已发现的胶原至少有 19 种（表 10-1），由不同的结构基因编码，具有不同的化学结构及免疫学特性。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ及XI型胶原为有横纹的纤维形胶原。

各型胶原都是由三条相同或不同的肽链形成三股螺旋，含有三种结构：螺旋区，

非螺旋区及球形结构域。其中 I 型胶原的结构最为典型。

表 10-1 胶原的类型

Type	Approximate Fiber Length	Occurence
I	300 nm	Skin, teeth, bones, tendoms, cornea
II	300 nm	cartilage, invertebral discs, notochord
III	300 nm	skin, tendons, blood vessel/uterine walls
IV	390 nm	basal laminae, kidney glomerulus, eye lens capsule
V	300 nm	cornea, interstitial tissues
VI	105 nm	cartilagenous/noncartilagenous connective tissues
VII	450 nm	skin's basal lamina, tongue, cornea, sclera, amnion
VIII	150 nm	minor constituent of cartilage, sclera
IX	200 nm	minor constituent of cartilage
X	150 nm	minor constituent of cartilage, in cartilagenous regions undergoing transition to bone
XI	Unknown	minor constituent of cartilage
XII	Unknown	minor constituent of tendons
XIII	Unknown	endothelial tissues
XIV	Unknown	fetal skin and tendon

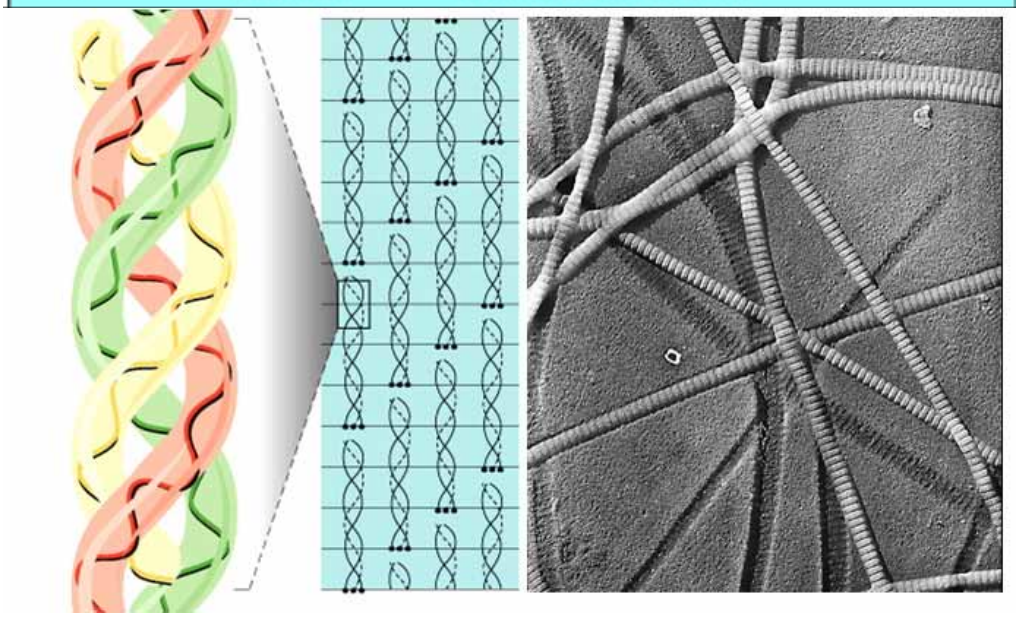


图 10-4 胶原的结构（左模式图，右电镜照片）

I 型胶原的原纤维平行排列成较粗大的束，成为光镜下可见的胶原纤维，抗张强度超过钢筋。其三股螺旋由二条 α_1（I）链及一条 α_2（I）链构成。每条 α 链约含 1050 个氨基酸残基，由重复的 Gly-X-Y 序列构成。X 常为 Pro（脯氨酸），Y 常为羟脯氨酸或羟赖氨酸残基。重复的 Gly-X-Y 序列使 α 链卷曲为左手螺旋，每圈含 3 个氨基酸残基。三股这样的螺旋再相互盘绕成右手超螺旋，即原胶原。

原胶原分子间通过侧向共价交联，相互呈阶梯式有序排列聚合成直径

50~200nm、长 150nm 至数微米的原纤维，在电镜下可见间隔 67nm 的横纹。胶原原纤维中的交联键是由侧向相邻的赖氨酸或羟赖氨酸残基氧化后所产生的两个醛基间进行缩合而形成的。

原胶原共价交联后成为具有抗张强度的不溶性胶原。胚胎及新生儿的胶原因缺乏分子间的交联而易于抽提。随年龄增长，交联日益增多，皮肤、血管及各种组织变得僵硬，成为老化的一个重要特征。

人 α_1（Ⅰ）链的基因含 51 个外显子，因而基因转录后的拼接十分复杂。翻译出的肽链称为前 α 链，其两端各具有一段不含 Gly-X-Y 序列的前肽。三条前 α 链的 C 端前肽借二硫键形成链间交联，使三条前 α 链“对齐”排列。然后从 C 端向 N 端形成三股螺旋结构。前肽部分则呈非螺旋卷曲。带有前肽的三股螺旋胶原分子称为前胶原（procollagen）。胶原变性后不能自然复性重新形成三股螺旋结构，原因是成熟胶原分子的肽链不含前肽，故而不能再进行“对齐”排列。

前 α 链在粗面内质网上合成，并在形成三股螺旋之前于脯氨酸及赖氨酸残基上进行羟基化修饰，脯氨酸残基的羟化反应是在与膜结合的脯氨酰-4 羟化酶及脯氨酰-3 羟化酶的催化下进行的。维生素 C 是这两种酶所必需的辅助因子。维生素 C 缺乏导致胶原的羟化反应不能充分进行，不能形成正常的胶原原纤维，结果非羟化的前 α 链在细胞内被降解。因而，膳食中缺乏维生素 C 可导致血管、肌腱、皮肤变脆，易出血，称为坏血病。

二、纤粘连蛋白（fibronectin，FN）

FN 是一种大型的糖蛋白，存在于所有脊椎动物，分子含糖 4.5－9.5%，糖链结构依组织细胞来源及分化状态而异。FN 可将细胞连接到细胞外基质上（图 10-5）。

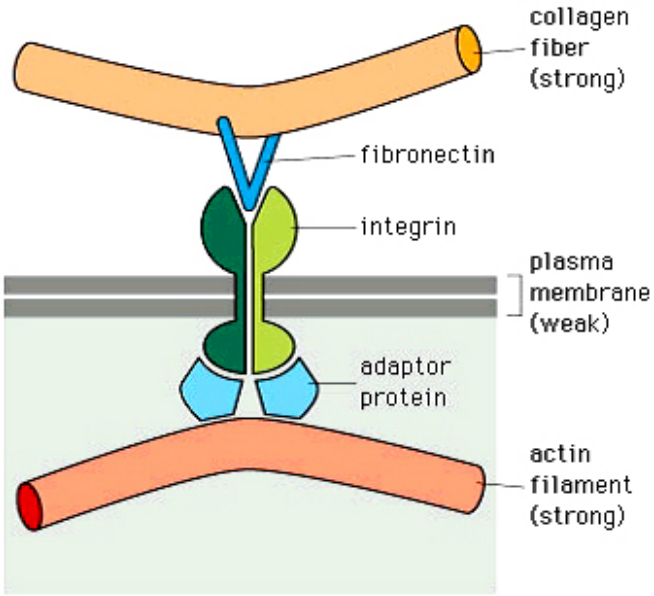


图 10-5 FN 将细胞连接到细胞外基质上

FN 以可溶形式存在于血浆（0．3mg/ml）及各种体液中；以不溶形式存在于细

胞外基质及细胞表面。前者总称血浆 FN；后者总称细胞 FN。

各种 FN 均由相似的亚单位（220KD 左右）组成。血浆 FN（450KD）是由二条相似的肽链在 C 端借二硫键联成的 V 字形二聚体（图 15-6）。细胞 FN 为多聚体。在人体中目前已鉴定的FN亚单位就有20种以上。它们都是由同一基因编码的产物。转录后由于拼接上的不同而形成多种异型分子。

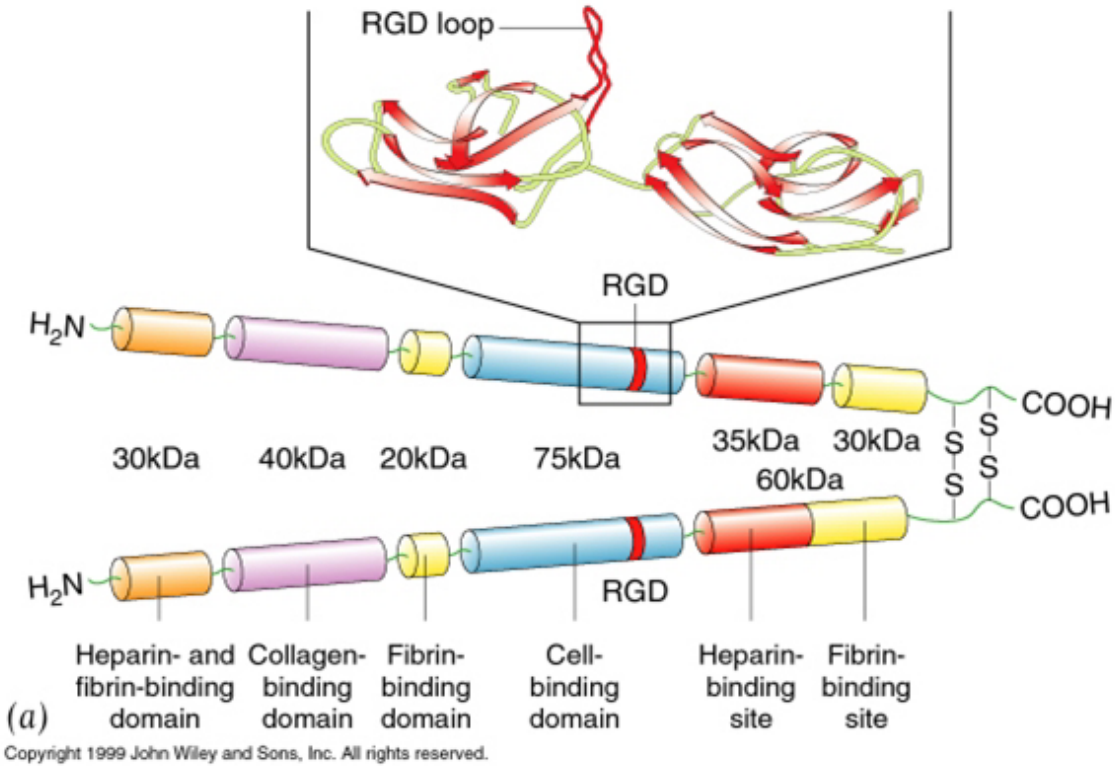


图 15-6 FN 的结构模型

每条 FN 肽链约含 2450 个氨基酸残基，整个肽链由三种类型（ I 、 II 、III）的模块（module）重复排列构成。具有 5－7 个有特定功能的结构域，由对蛋白酶敏感的肽段连接。这些结构域中有些能与其它 ECM（如胶原、蛋白聚糖）结合，使细胞外基质形成网络；有些能与细胞表面的受体结合，使细胞附着与 ECM 上。

FN 肽链中的一些短肽序列为细胞表面的各种 FN 受体识别与结合的最小结构单位。例如，在肽链中央的与细胞相结合的模块中存在 RGD（Arg-Gly-Asp）序列，为与细胞表面某些整合素受体识别与结合的部位。化学合成的 RGD 三肽可抑制细胞在 FN 基质上粘附。

细胞表面及细胞外基质中的 FN 分子间通过二硫键相互交联，组装成纤维。与胶原不同，FN 不能自发组装成纤维，而是通过细胞表面受体指导下进行的，只存在于某些细胞（如成纤维细胞）表面。转化细胞及肿瘤细胞表面的 FN 纤维减少或缺失系因细胞表面的 FN 受体异常所致。

三、层粘连蛋白（laminin，LN）

LN 也是一种大型的糖蛋白，与Ⅳ型胶原一起构成基膜，是胚胎发育中出现最早的细胞外基质成分。

LN 分子由一条重链（α）和二条轻链（β、γ）借二硫键交联而成，外形呈十字形，三条短臂各由三条肽链的 N 端序列构成。每一短臂包括二个球区及二个短杆区，长臂也由杆区及球区构成（图 10-7）。

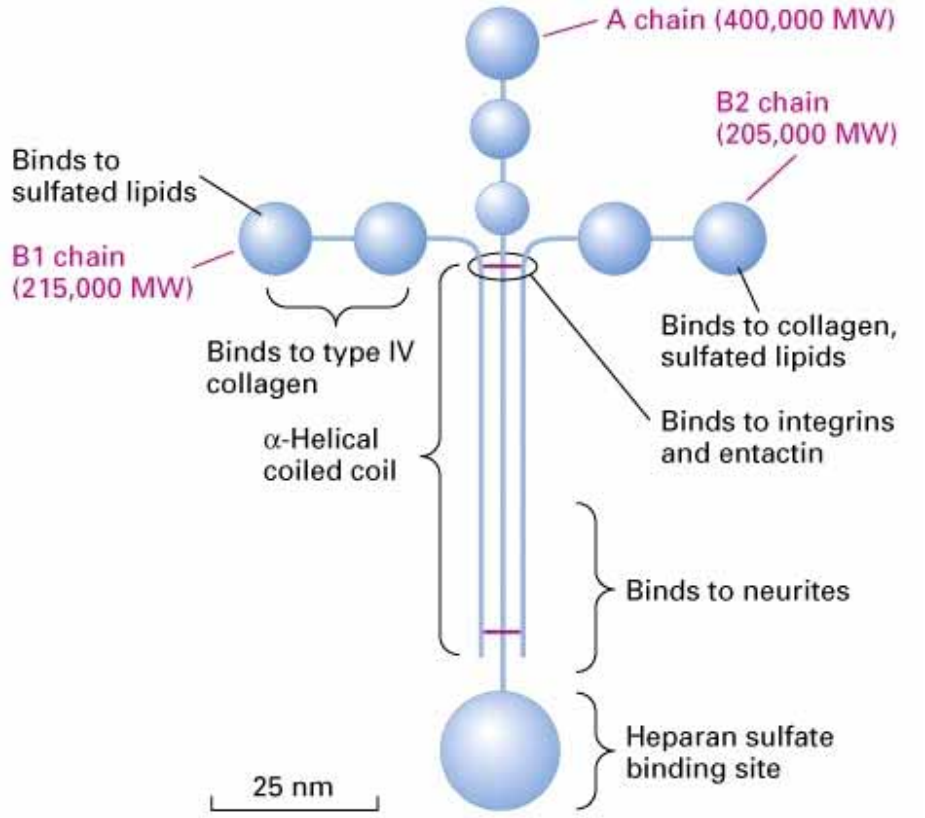


图 10-7 LN 的结构模型

LN 分子中至少存在 8 个与细胞结合的位点。例如，在长臂靠近球区的。链上有 IKVAV 五肽序列可与神经细胞结合，并促进神经生长。鼠 LNα1 链上的 RGD 序列，可与 αvβ3 整合素结合。

现已发现 7 种 LN 分子，8 种亚单位（α1,α2,α3,β1,β2,β3,γ1,γ2），与 FN 不同的是，这 8 种亚单位分别由 8 个结构基因编码。

LN 是含糖量很高（占 15-28％）的糖蛋白，具有 50 条左右 N 连接的糖链，是迄今所知糖链结构最复杂的糖蛋白。而且 LN 的多种受体是识别与结合其糖链结构的。

基膜是上皮细胞下方一层柔软的特化的细胞外基质，也存在于肌肉、脂肪和许旺细胞（schwann cell）周围。它不仅仅起保护和过滤作用，还决定细胞的极性，影响细胞的代谢、存活、迁移、增殖和分化。

基膜中除 LN 和Ⅳ型胶原外，还具有 entactin、perlecan、decorin 等多种蛋白，

其中 LN 与 entactin (also called nidogen)形成 1:1 紧密结合的复合物，通过 nidogen 与Ⅳ型胶原结合（图 10-8）。

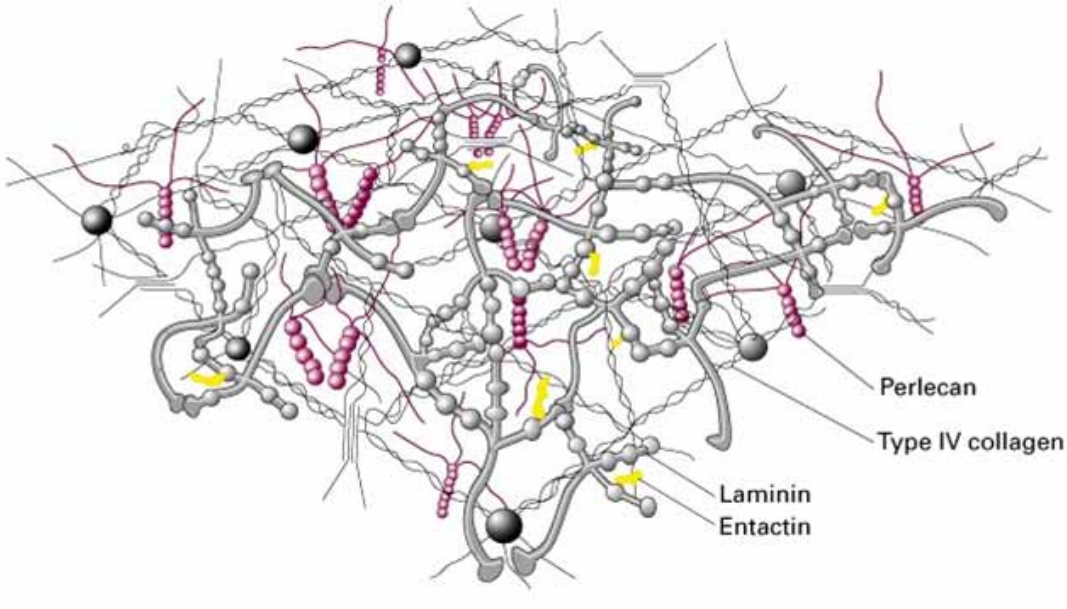


图 10-8 基膜的结构

四、氨基聚糖与蛋白聚糖

1．氨基聚糖（glycosaminoglycan，GAG）

GAG 是由重复二糖单位构成的无分枝长链多糖（图 10-9）。其二糖单位通常由氨基已糖（氨基葡萄糖或氨基半乳糖）和糖醛酸组成（表 11-1），但硫酸角质素中糖醛酸由半乳糖代替。氨基聚糖依组成糖基、连接方式、硫酸化程度及位置的不同可分为六种，即：透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素、肝素、硫酸角质素。

透明质酸（hyaluronic acid ，HA）是唯一不发生硫酸化的氨基聚糖，其糖链特别长。氨基聚糖一般由不到 300 个单糖基组成，而 HA 可含 10 万个糖基。在溶液中 HA 分子呈无规则卷曲状态。如果强行伸长，其分子长度可达 20μm。HA 整个分子全部由葡萄糖醛酸及乙酰氨基葡萄糖二糖单位重复排列构成。由于 HA 分子表面有大量带负电荷的亲水性基团，可结合大量水分子，因而即使浓度很低也能形成粘稠的胶体，占据很大的空间，产生膨压。

细胞表面的 HA 受体为 CD44 及其同源分子，属于 hyaladherin 族。所有能结合 HA 的分子都具相似的结构域。

HA 虽不与蛋白质共价结合，但可与许多种蛋白聚糖的核心蛋白质及连接蛋白质借非共价键结合而参加蛋白聚糖多聚体的构成，在软骨基质中尤其如此。

除 HA 及肝素外，其他几种氨基聚糖均不游离存在，而与核心蛋白质共价结合

构成蛋白聚糖。

表 10-2 氨基聚糖的分子特性及组织分布

氨基聚糖	二糖单位	硫酸基	分布组织
透明质酸	葡萄糖醛酸，N-乙酰葡萄糖	0	结缔组织、皮肤、软骨、玻璃体、滑液
硫酸软骨素	葡萄糖醛酸，N-乙酰半乳糖	0.2-2.3	软骨、角膜、骨、皮肤、动脉
硫酸皮肤素	葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸，N-乙酰葡萄糖	1.0-2.0	皮肤、血管、心、心瓣膜
硫酸乙酰肝素	葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸，N-乙酰葡萄糖	0.2-3.0	肺、动脉、细胞表面
肝素	葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸，N-乙酰葡萄糖	2.0-3.0	肺、肝、皮肤、肥大细胞
硫酸角质素	半乳糖-N 乙酰葡萄糖	0.9-1.8	软骨、角膜、椎间盘

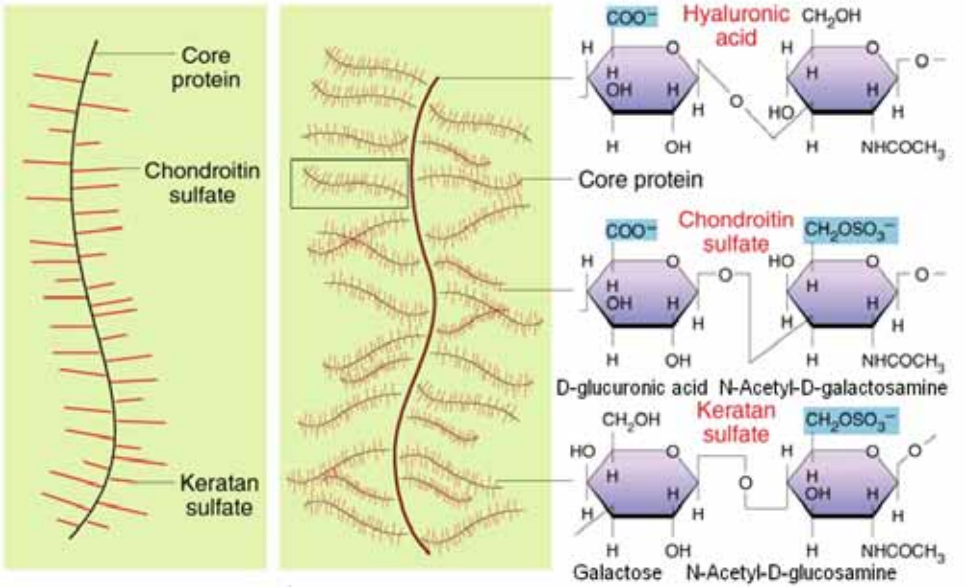


图 10-9 左，蛋白聚糖；中蛋白聚糖多聚体；右，氨基聚糖

2．蛋白聚糖（proteoglycan）

蛋白聚糖是氨基聚糖（除透明质酸外）与核心蛋白质（coreprotein）的共价结合物。核心蛋白质的丝氨酸残基（常有 Ser-Gly-X-Gly 序列）可在高尔基复合体中装配上氨基聚糖（GAG）链。其糖基化过程为通过逐个转移糖基首先合成由四糖组成的连接桥（Xyl-Gal-Gal-GlcUA），然后再延长糖链，并对所合成的重复二糖单位进行硫酸化及差向异构化修饰。一个核心蛋白质分子上可以连接 1 至 100 个以上 GAG 链。与一个核心蛋白质分子相连的 GAG 链可以是同种或不同种的。

许多蛋白聚糖单体常以非共价键与透明质酸形成多聚体。核心蛋白质的 N 端序列与 CD44 分子结合透明质酸的结构域具有同源性，故亦属 hyaladherin 族。

蛋白聚糖多聚体（图 18-9）的分子量可达 10^8KD 以上。其体积可超过细菌。

如构成软骨的 Aggrecan，其 GAG 主要是硫酸软骨素（chondroitin sulfate，CS），但还有硫酸角质素（keratan sulfate，KS）。其含量不足或代谢障碍可引起长骨发育不良，四肢短小。

五、弹性蛋白（elastin）

弹性蛋白纤维网络赋予组织以弹性，弹性纤维的伸展性比同样横截面积的橡皮条至少大 5 倍。

弹性蛋白由二种类型短肽段交替排列构成。一种是疏水短肽赋予分子以弹性；另一种短肽为富丙氨酸及赖氨酸残基的 α 螺旋，负责在相邻分子间形成交联。弹性蛋白的氨基酸组成似胶原，也富于甘氨酸及脯氨酸，但很少含羟脯氨酸，不含羟赖氨酸，没有胶原特有的 Gly-X-Y 序列，故不形成规则的三股螺旋结构。弹性蛋白分子间的交联比胶原更复杂。通过赖氨酸残基参与的交联形成富于弹性的网状结构（图 10-10）。

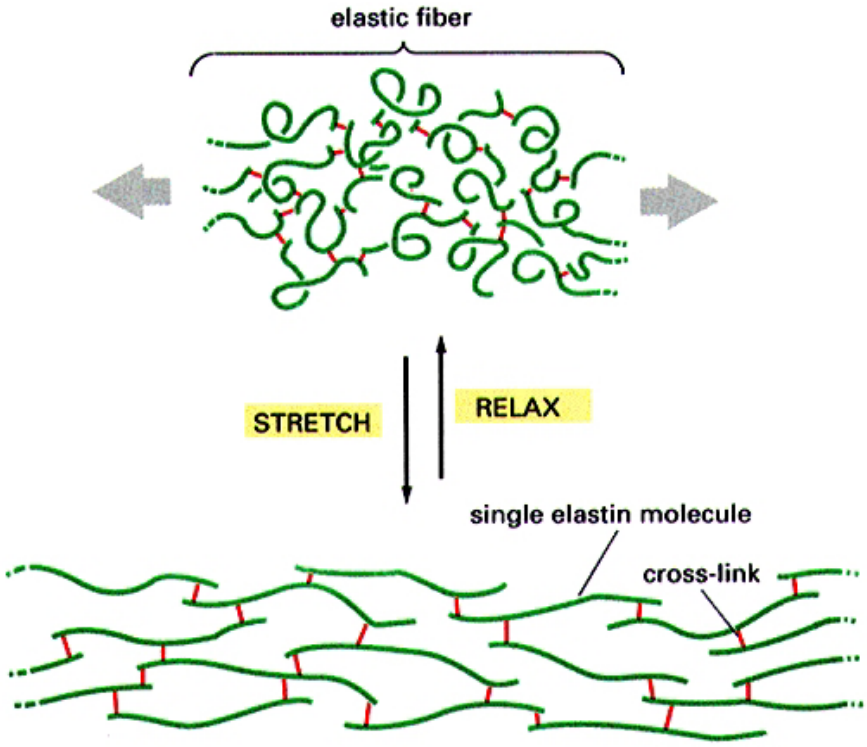


图 10-10 弹性蛋白结构模型

在弹性蛋白的外围包绕着一层由微原纤维构成的壳。微原纤维是由一些糖蛋白构成的。其中一种较大的糖蛋白是 fibrillin，为保持弹性纤维的完整性所必需。在发育中的弹性组织内，糖蛋白微原纤维常先于弹性蛋白出现，似乎是弹性蛋白附着的框架，对于弹性蛋白分子组装成弹性纤维具有组织作用。老年组织中弹性蛋白的生成减少，降解增强，以致组织失去弹性。

第二节 细胞外基质的生物学作用

细胞外基质不只具有连接、支持、保水、抗压及保护等物理学作用，而且对细胞的基本生命活动发挥全方位的生物学作用。

1．影响细胞的存活、生长与死亡

正常真核细胞，除成熟血细胞外，大多须粘附于特定的细胞外基质上才能抑制凋亡而存活，称为定着依赖性（anchorage dependence）。例如，上皮细胞及内皮细胞一旦脱离了细胞外基质则会发生程序性死亡。此现象称为凋亡（anoikis，a Greek word meaning “homelessness”）。

不同的细胞外基质对细胞增殖的影响不同。例如，成纤维细胞在纤粘连蛋白基质上增殖加快，在层粘连蛋白基质上增殖减慢；而上皮细胞对纤粘连蛋白及层粘连蛋白的增殖反应则相反。肿瘤细胞的增殖丧失了定着依赖性，可在半悬浮状态增殖。

2．决定细胞的形状

体外实验证明，各种细胞脱离了细胞外基质呈单个游离状态时多呈球形。同一种细胞在不同的细胞外基质上粘附时可表现出完全不同的形状。上皮细胞粘附于基膜上才能显现出其极性。细胞外基质决定细胞的形状这一作用是通过其受体影响细胞骨架的组装而实现的。不同细胞具有不同的细胞外基质，介导的细胞骨架组装的状况不同，从而表现出不同的形状。

3．控制细胞的分化

细胞通过与特定的细胞外基质成分作用而发生分化。例如，成肌细胞在纤粘连蛋白上增殖并保持未分化的表型；而在层粘连蛋白上则停止增殖，进行分化，融合为肌管。

4．参与细胞的迁移

细胞外基质可以控制细胞迁移的速度与方向，并为细胞迁移提供“脚手架”。例如，纤粘连蛋白可促进成纤维细胞及角膜上皮细胞的迁移；层粘连蛋白可促进多种肿瘤细胞的迁移。细胞的趋化性与趋触性迁移皆依赖于细胞外基质。这在胚胎发育及创伤愈合中具有重要意义。细胞的迁移依赖于细胞的粘附与细胞骨架的组装。细胞粘附于一定的细胞外基质时诱导粘着斑的形成，粘着斑是联系细胞外基质与细胞骨架“铆钉”。

由于细胞外基质对细胞的形状、结构、功能、存活、增殖、分化、迁移等一切生命现象具有全面的影响，因而无论在胚胎发育的形态发生、器官形成过程中，或在维持成体结构与功能完善（包括免疫应答及创伤修复等）的一切生理活动中均具有不可忽视的重要作用。

第十一章 细胞连接与细胞粘附分子

细胞与细胞间或细胞与细胞外基质的联结结构称为细胞连接（cell junction）。细胞连接的体积很小，只有在电镜下才能观察到。可分为三大类，即：封闭连接（occluding junction）、锚定连接（anchoring junction）和通讯连接（communicating junction）。

第一节 细胞连接

一、封闭连接

（一）紧密连接（tight junction）

又称封闭小带（zonula occludens），存在于脊椎动物的上皮细胞间（图 11-1），长度约 50~400nm，相邻细胞之间的质膜紧密结合，没有缝隙。在电镜下可以看到连接区域具有蛋白质形成的焊接线网络，焊接线也称嵴线（图 11-2，3），封闭了细胞与细胞之间的空隙。上皮细胞层对小分子的透性与嵴线的数量有关，有些紧密连接甚至连水分子都不能透过。

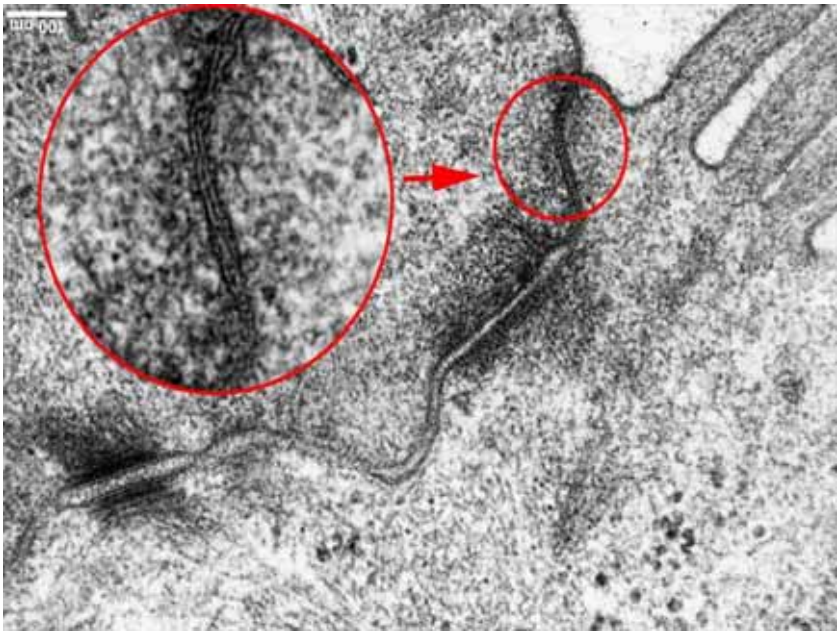


图 11-1 紧密连接位于上皮细胞的上端

紧密连接的焊接线由跨膜细胞粘附分子构成，主要的跨膜蛋白为 claudin 和 occludin，另外还有膜的外周蛋白 ZO。

紧密连接的主要作用是封闭相邻细胞间的接缝，防止溶液中的分子沿细胞间隙渗入体内，从而保证了机体内环境的相对稳定；消化道上皮、膀胱上皮、脑毛细血管内皮以及睾丸支持细胞之间都存在紧密连接。后二者分别构成了脑血屏障和睾血屏障，能保护这些重要器官和组织免受异物侵害。在各种组织中紧密连接对一些小分子的密封程度有所不同，例如小肠上皮细胞的紧密连接对 Na^+的渗漏程度比膀胱上皮大 1 万倍。

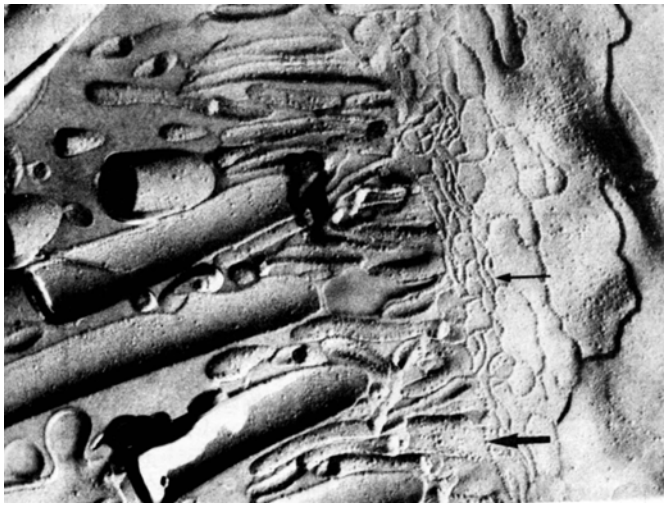
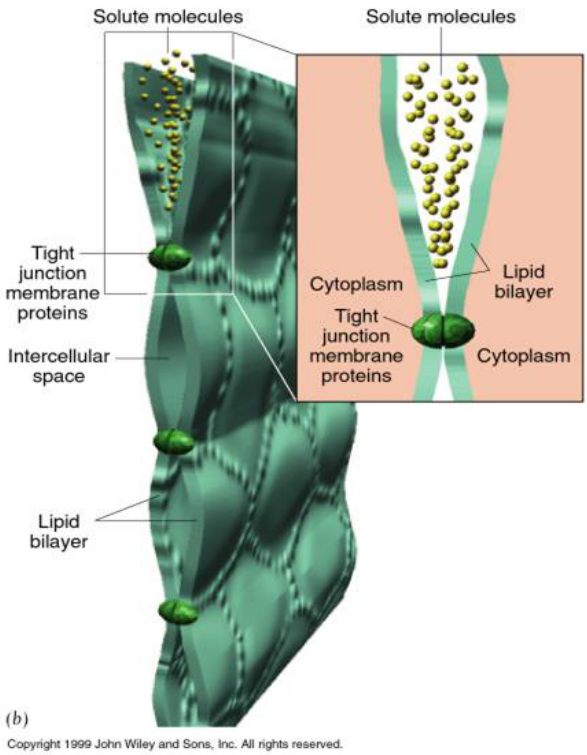


图 11-2 兔子上皮细胞的紧密连接（冰冻蚀刻）



Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

图 11-3 紧密连接的模式图

（二）间壁连接（septate junctions）

是存在于无脊椎动物上皮细胞的紧密连接（图 11-4）。连接蛋白呈梯子状排列，形状非常规则，连接的细胞内骨架成分为肌动蛋白纤维。在果蝇中一种叫做 discs-large 的蛋白参与形成间壁连接，突变品种不仅不能形成间壁连接，还产生瘤突。

图 11-4 间壁连接存在于无脊椎动物

二、锚定连接

（一）粘合带与粘合斑

粘合带（adhesion belt）呈带状环绕细胞，一般位于上皮细胞顶侧面的紧密连接下方（图 11-5）。在粘合带处相邻细胞的间隙约 15～20nm。

间隙中的粘合分子为 E-钙粘素（图 11-6）。在质膜的内侧有几种附着蛋白与钙粘素结合在一起，这些附着蛋白包括：α-，β-，γ-连锁蛋白（catenin）、粘着斑蛋白（vinculin）、α-辅肌动蛋白（α-actinin）和片珠蛋白（plakoslobin）。

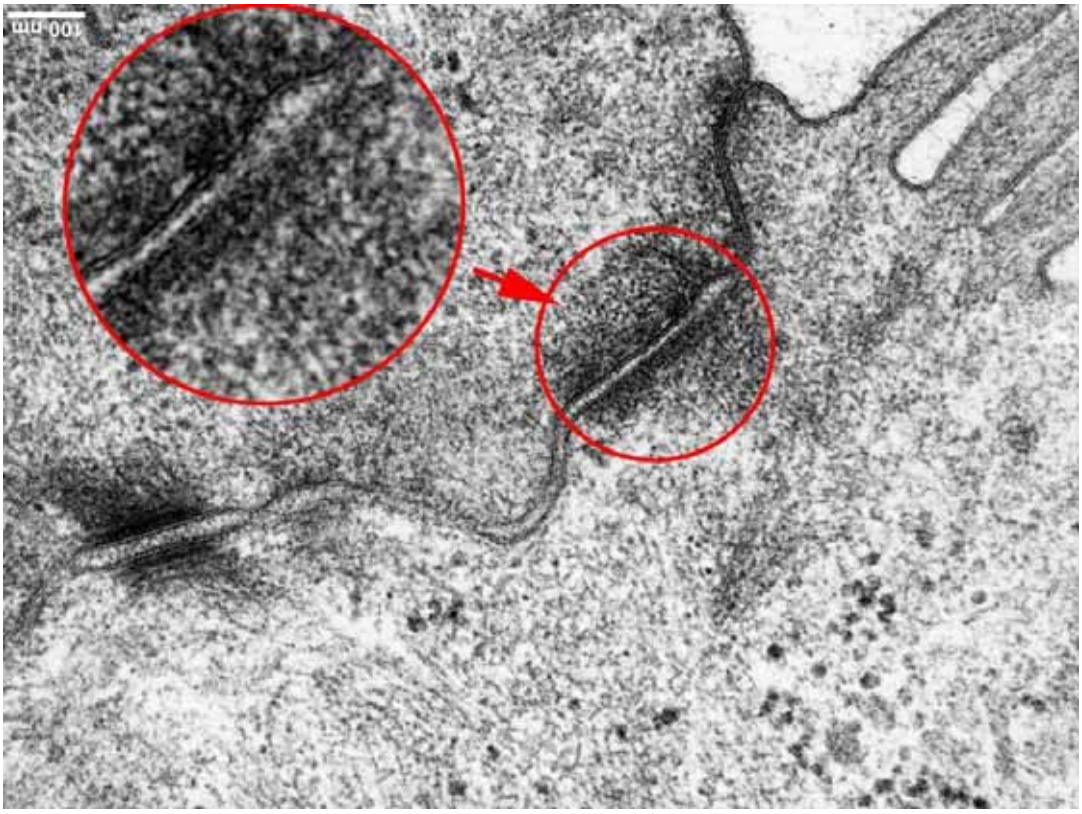


图 11-5 粘合带位于紧密连接下方

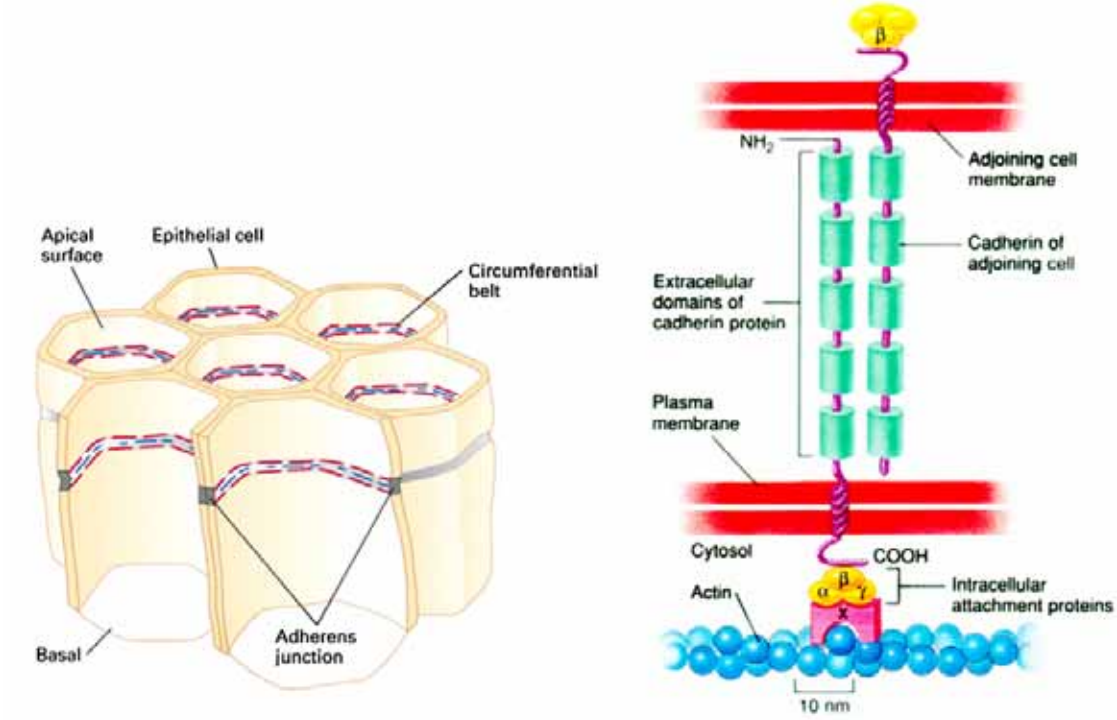


图 11-6 粘合带结构模型

粘合带处的质膜下方有与质膜平行排列的肌动蛋白束，钙粘蛋白通过附着蛋白

与肌动蛋白束相结合。于是，相邻细胞中的肌动蛋白丝束通过钙粘蛋白和附着蛋白编织成了一个广泛的网络，把相邻细胞联合在一起。

粘合斑（adhesion plaque）位于细胞与细胞外基质间，通过整合素（integrin）把细胞中的肌动蛋白束和基质连接起来。连接处的质膜呈盘状，称为粘合斑。

（二）桥粒与半桥粒

桥粒（desmosome）存在于承受强拉力的组织中，如皮肤、口腔、食管等处的复层鳞状上皮细胞之间和心肌中（图 11-7）。相邻细胞间形成纽扣状结构，细胞膜之间的间隙约 30nm，质膜下方有细胞质附着蛋白质，如片珠蛋白（plakoglobin）、桥粒斑蛋白（desmoplakin）等，形成一厚约 15～20nm 的致密斑。斑上有中间纤维相连，中间纤维的性质因细胞类型而异，如：在上皮细胞中为角蛋白丝（keratin filaments），在心肌细胞中则为结蛋白丝（desmin filaments）。桥粒中间为钙粘素（desmoglein 及 desmocollin）。因此相邻细胞中的中间纤维通过细胞质斑和钙粘素构成了穿胞细胞骨架网络（图 11-8）。

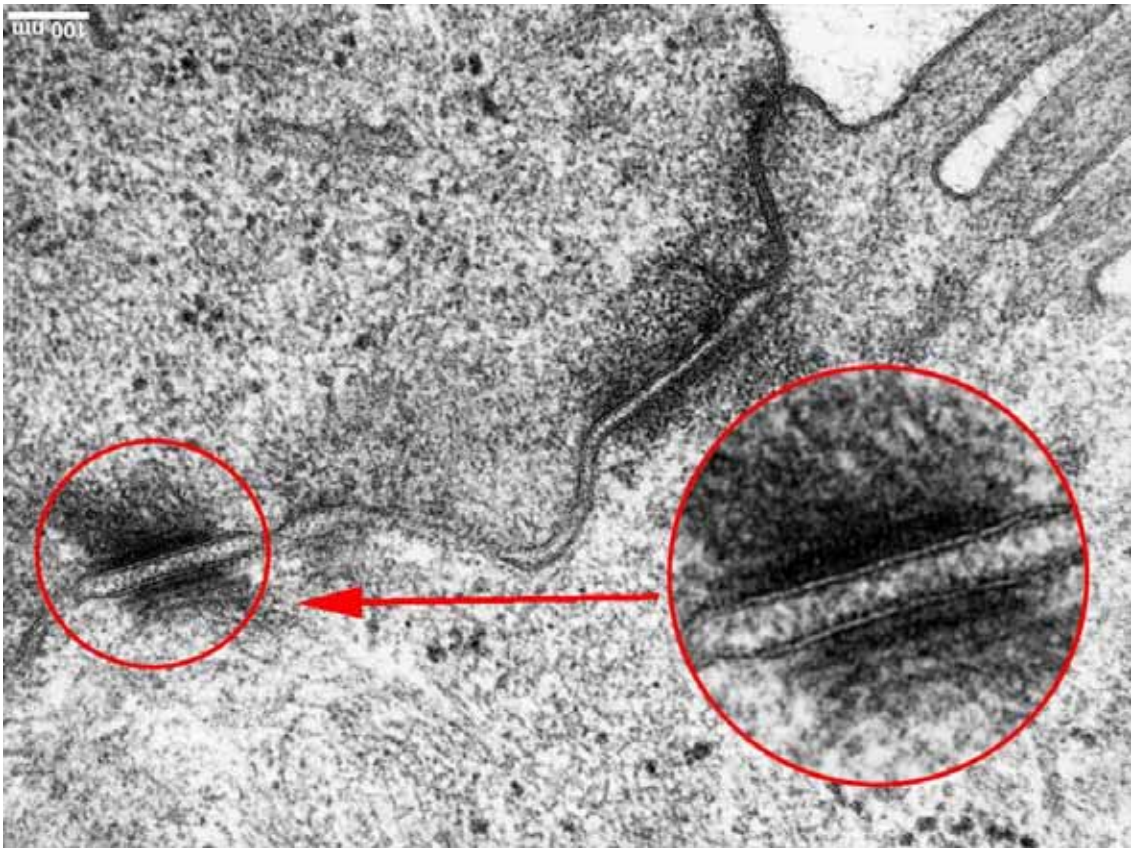


图 11-7 桥粒位于粘合带下方

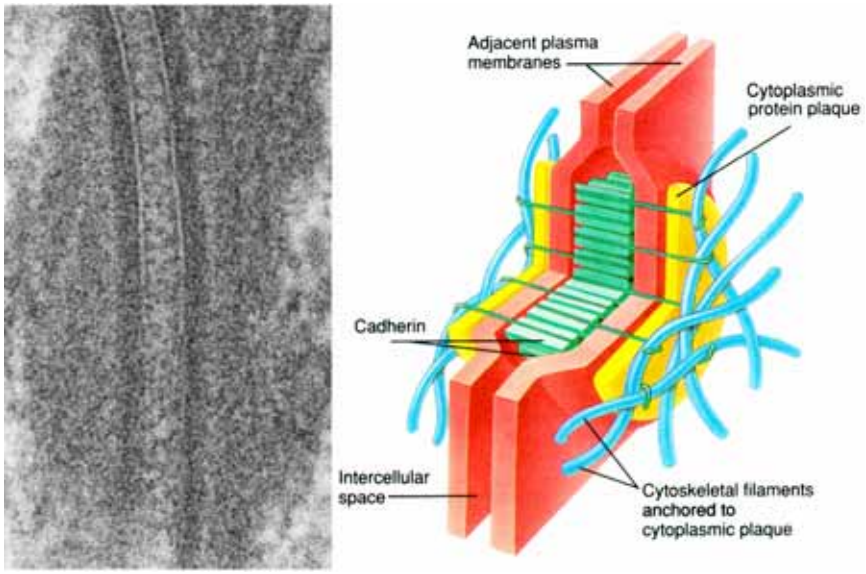


图 11-8 桥粒的结构模型

半桥粒（hemidesmosome）在结构上类似桥粒，位于上皮细胞基面与基膜之间（图 11-9），它桥粒的不同之处在于：①只在质膜内侧形成桥粒斑结构，其另一侧为基膜；②穿膜连接蛋白为整合素（integrin）而不是钙粘素，整合素是细胞外基质的受体蛋白；③细胞内的附着蛋白为角蛋白（keratin）。

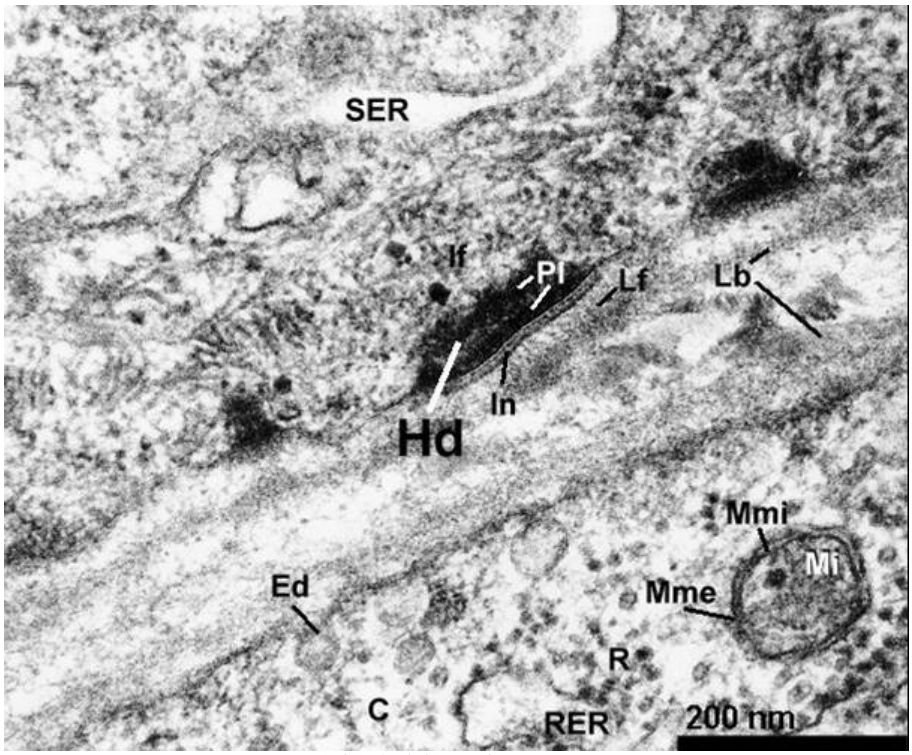


图 11-9 半桥粒连接上皮细胞基面和基膜

三、通讯连接

（一）间隙连接

间隙连接（gap junction）存在于大多数动物组织。在连接处相邻细胞间有 2～4nm 的缝隙（图 11-10），而且连接区域比紧密连接大得多，最大直径可达 0.3μm。在间隙与两层质膜中有大量蛋白质颗粒，是构成间隙连接的基本单位，称连接子（connexon），由 6 个相同或相似的跨膜蛋白亚单位环绕而成，直径 8nm，中心形成一个直径约 1.5nm 的孔道(图 11-11)。通过向细胞内注射分子量不同的染料，证明间隙连接的通道可以允许分子量小于 1.5KD 的分子通过。这表明细胞内的小分子，如无机盐离子、糖、氨基酸、核苷酸和维生素等有可能通过间隙连接的孔隙。

间隙连接的通透性是可调节的，在实验条件下，降低细胞 PH 值，或升高钙离子浓度均可降低间隙连接的通透性。当细胞破损时，大量钙离子进入，导致间隙连接关闭，以免正常细胞受到伤害。

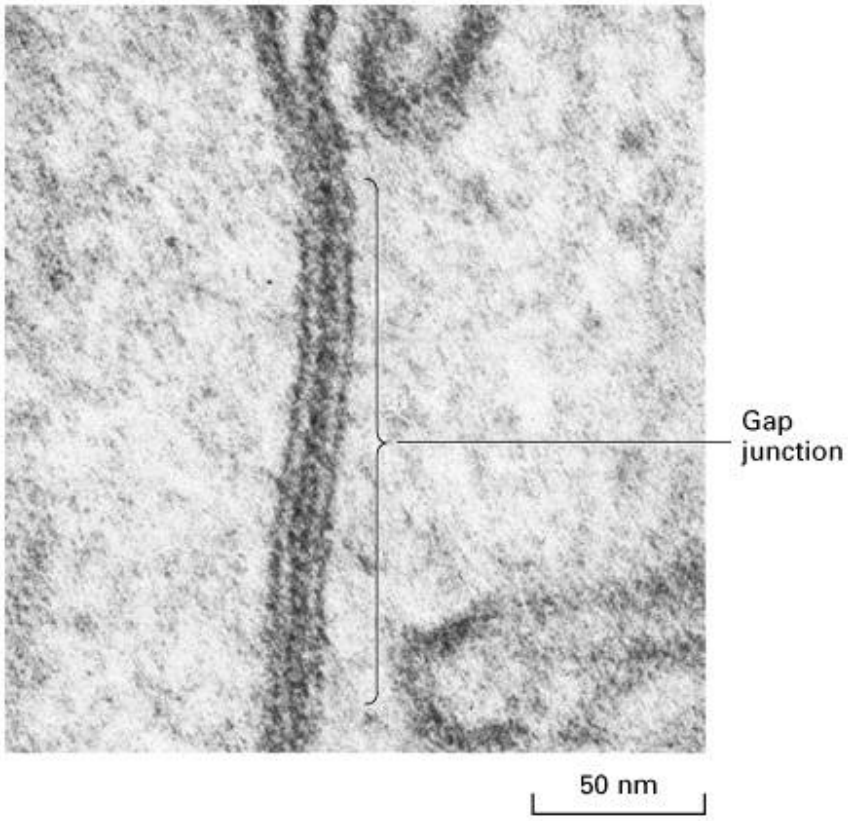


图 11-10 间隙连接电镜照片

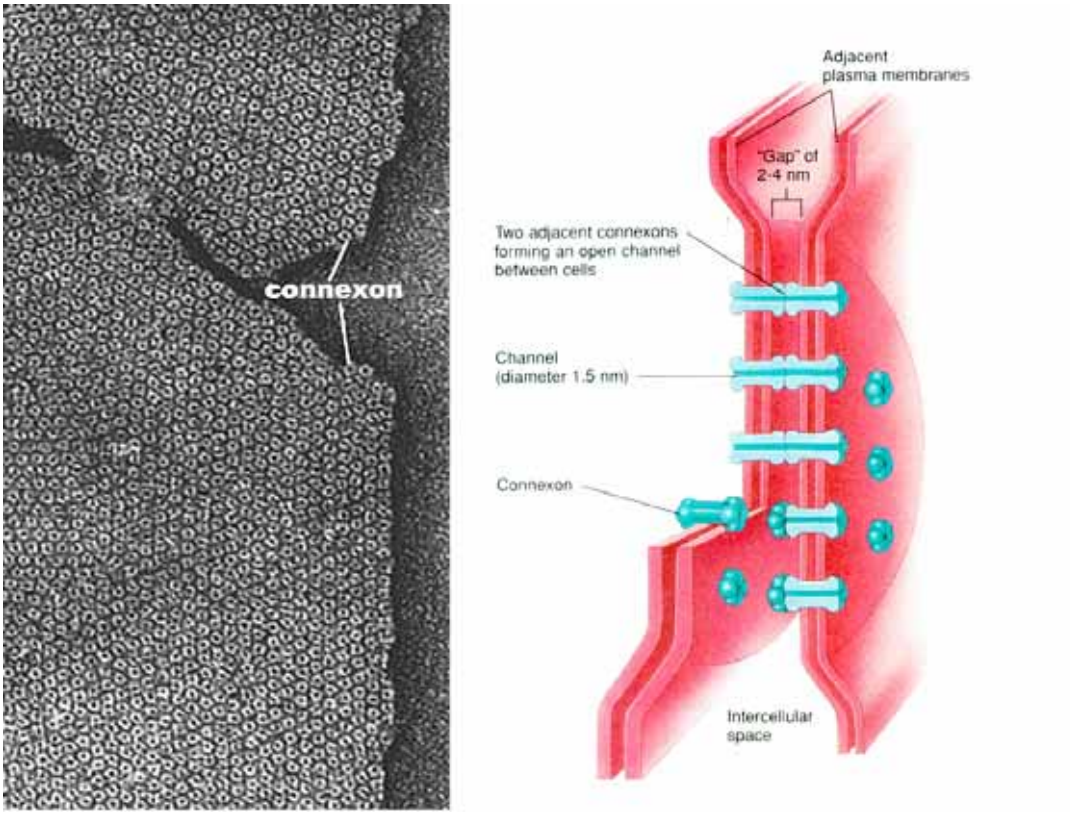


图 11-11 左，连接子电镜照片；右，间隙连接模型

间隙连接的功能包括：

1．参与细胞分化：胚胎发育的早期，细胞间通过间隙连接相互协调发育和分化。小分子物质即可在一定细胞群范围内，以分泌源为中心，建立起递变的扩散浓度梯度，以不同的分子浓度为处于梯度范围内的细胞提供"位置信息"（positional information），从而诱导细胞按其在胚胎中所处的局部位置向着一定方向分化。

2．协调代谢：例如，在体外培养条件下，把不能利用外源次黄嘌呤合成核酸的突变型成纤维细胞和野生型成纤维细胞共同培养，则两种细胞都能吸收次黄嘌呤合成核酸。如果破坏细胞间的间隙连接，则突变型细胞不能吸收次黄嘌呤合成核酸。

3、构成电紧张突触：平滑肌、心肌、神经末梢间均存在的这种间隙连接，称为电紧张突触（electrotonic synapses）。电紧张突触无须依赖神经递质或信息物质即可将一些细胞的电兴奋活动传递到相邻的细胞。

（二）胞间连丝

胞间连丝（plasmodesmata）是植物细胞特有的通讯连接。是由穿过细胞壁的质膜围成的细胞质通道，直径约 20～40nm。因此植物体细胞可看作是一个巨大的合胞体（syncytium）。通道中有一由膜围成的筒状结构，称为连丝小管（desmotubule）。连丝小管由光面内质网特化而成，管的两端与内质网相连。连丝小管与胞间连丝的质膜内衬之间，填充有一圈细胞质溶质（cytosol）。一些小分子可通过细胞质溶质环在相邻细胞间传递(图 11-12)。

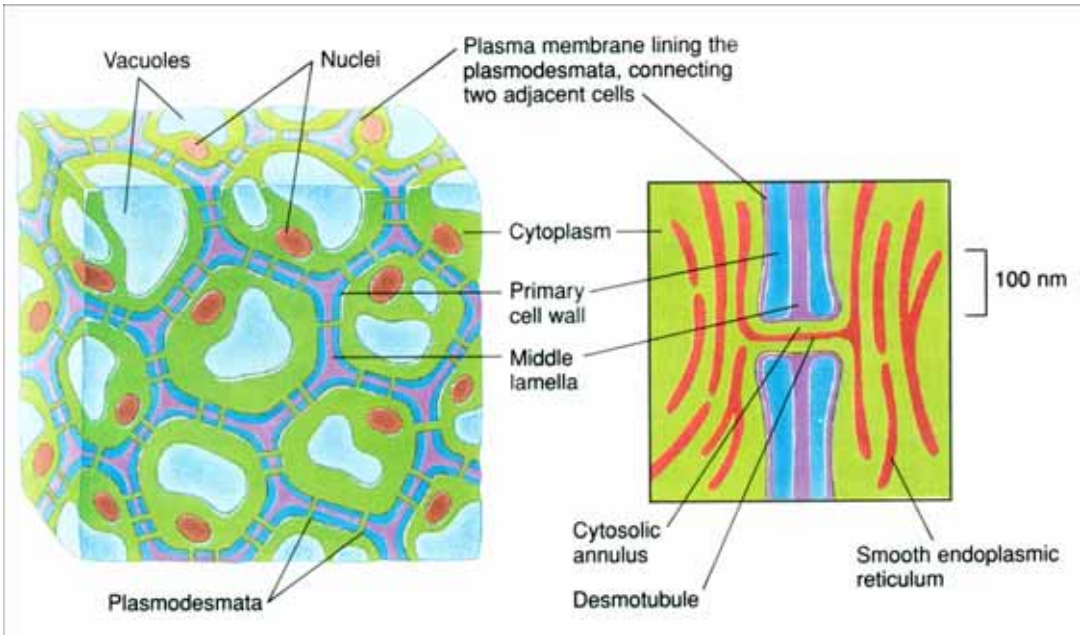


图 11-12 胞间连丝结构模型

胞间连丝在功能上与动物细胞间的间隙连接类似，它允许分子量小于 800Da 的分子通过，在相邻细胞间起通讯作用。但通过胞间连丝的分子运输也要受到调节。实验证明，在胞间连丝正常的情况下，有些低分子量的染料分子却不能通过。然而某些植物病毒能制造特殊的蛋白质，这种蛋白质同胞间连丝结合后，可使胞间连丝的有效孔径扩大，使病毒粒子得以通过胞间连丝在植物体内自由播散和感染。

胞间连丝还对细胞分化起一定作用。在高等植物中，顶端分生组织的细胞分化与胞间连丝的分布有着相应的关系。随着细胞的生长和延长，侧壁上的胞间连丝逐渐减少，而横壁上的却仍保持很多。植物相邻细胞间的细胞核可经胞间连丝穿壁。

（三）化学突触

化学突触（synapse）是存在于可兴奋细胞间的一种连接方式，其作用是通过释放神经递质来传导兴奋。由突触前膜(presynaptic membrane)、突触后膜(postsynaptic membrane)和突触间隙(synaptic cleft)三部分组成（图 11-13、14）。

突触前神经元的突起末梢膨大呈球形，称突触小体(synaptic knob)。突触小体贴附在突触后神经元的胞体或突起的表面形成突触。突触小体的膜称突触前膜，与突触前膜相对的胞体膜或突起的膜称突触后膜，两膜之间称为突触间隙。间隙的宽度约 20-30nm，内含有粘多糖和糖蛋白等物质。

突触小体内有许多囊泡，称突触小泡(synaptic vesicle)，内含神经递质。当神经冲动传到突触前膜，突触小泡释放神经递质，为突触后膜的受体接受（配体门通道），引起突触后膜离子通透性改变，膜去极化或超极化。

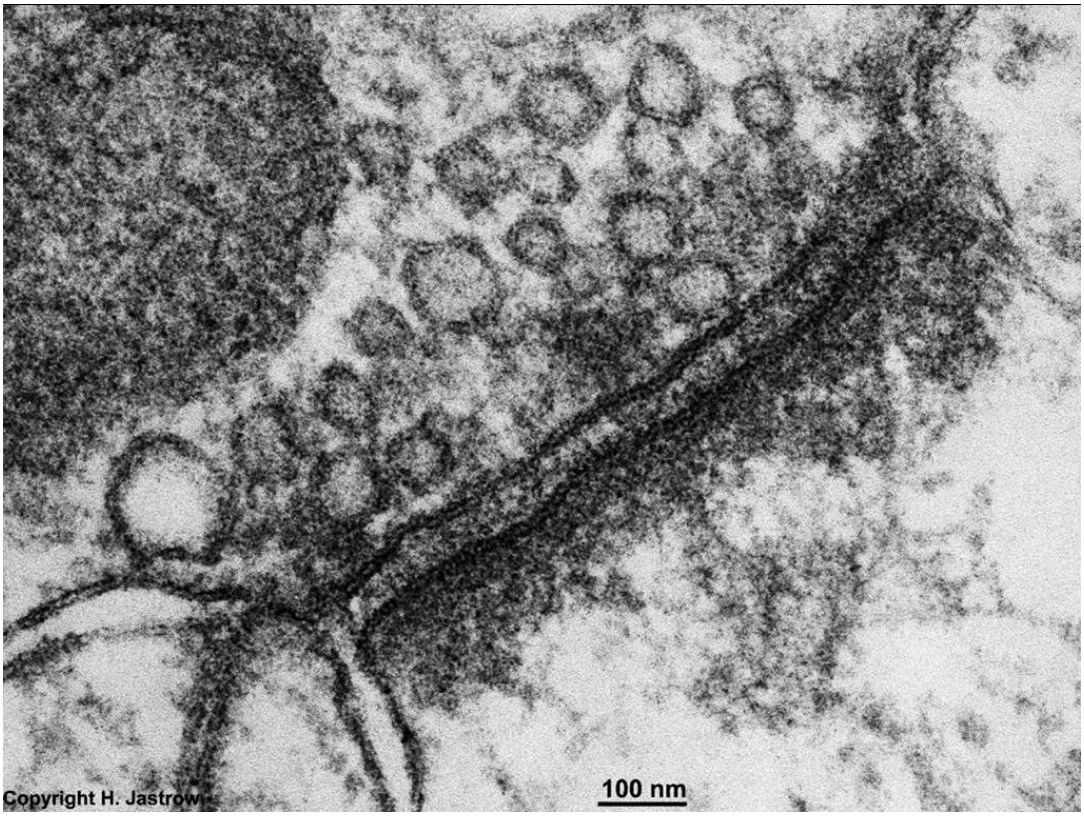


图 11-13 化学突触的结构（具有小囊泡的一侧为突触前膜）

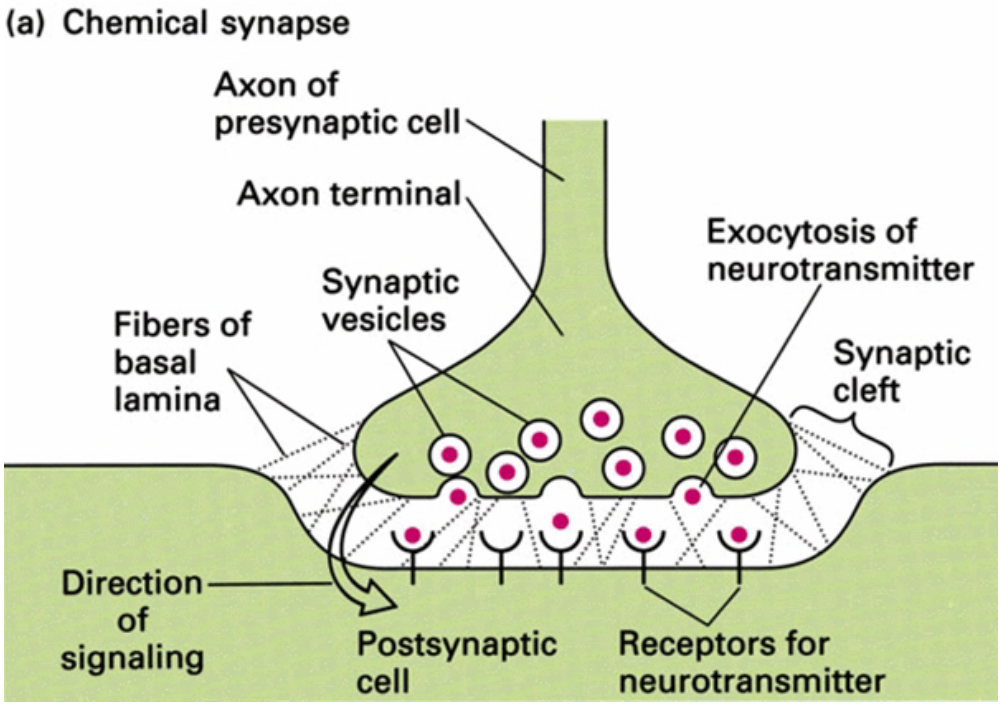


图 11-14 化学突触的结构模型

表 10-1 各种连接的比较

名称	主要分布组织
E-钙粘素	着床前的胚胎、上皮细胞（在带状粘合处特别集中）
P-钙粘素	胎盘滋养层细胞、心、肺、小肠
N-钙粘素	胚胎中胚层、神经外胚层、神经系统（脑、神经节）、心、肺
M-钙粘素	成肌细胞、骨骼肌细胞
R-粘素	视网膜神经细胞、神经胶质细胞
Ksp-钙粘素	肾
OB-钙粘素	成骨细胞
VB-钙粘素	脉管内皮细胞
desmoglein	桥粒
desmocollin	桥粒

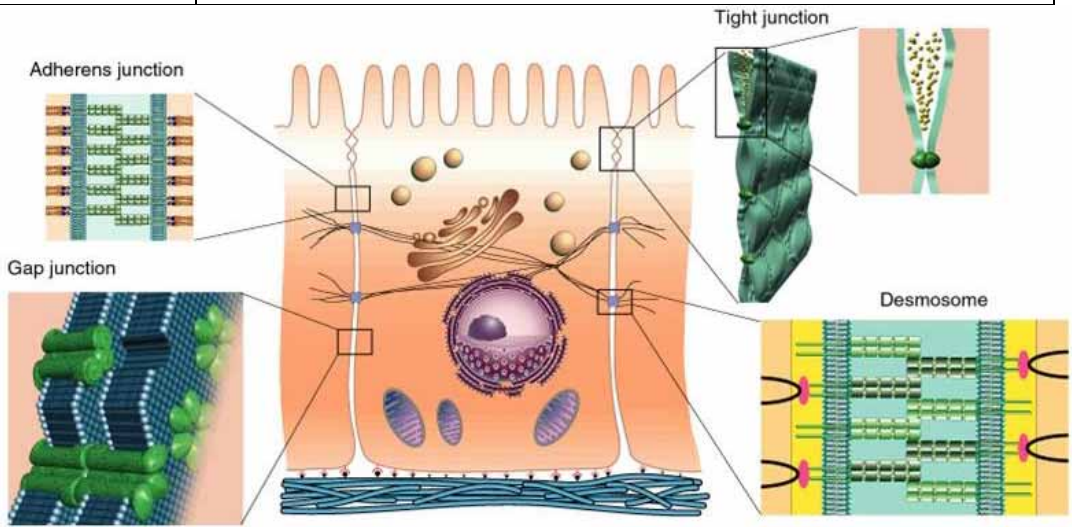


图 11-15 几类细胞连接的比较

第二节 细胞粘附分子

细胞粘附分子（cell adhesion molecule，CAM）是参与细胞与细胞之间及细胞与细胞外基质之间相互作用的分子。可大致分为五类：钙粘素、选择素、免疫球蛋白超家族、整合素及透明质酸粘素。

细胞粘附分子都是跨膜糖蛋白，分子结构由三部分组成：①胞外区，肽链的 N 端部分，带有糖链，负责与配体的识别；②跨膜区，多为一次跨膜；③胞质区，肽链的 C 端部分，一般较小，或与质膜下的骨架成分直接相连，或与胞内的化学信号分子相连，以活化信号转导途径。

多数细胞粘附分子的作用依赖于二价阳离子，如 Ca^{2+}，Mg^{2+}。细胞粘附分子的作用机制有三种模式（图 11-16）：两相邻细胞表面的同种 CAM 分子间的相互识别与结合（亲同性粘附）；两相邻细胞表面的不同种 CAM 分子间的相互识别与结合（亲异性粘附）；两相邻细胞表面的相同 CAM 分子借细胞外的连接分子相互识别与

结合。

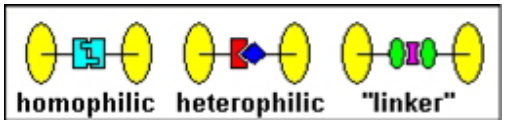


图 11-16 细胞粘附分子的作用方式

一、钙粘素

钙粘素（cadherin）属亲同性 CAM，其作用依赖于 Ca^{2+}。至今已鉴定出 30 种以上钙粘素（表 10-2），分布于不同的组织。

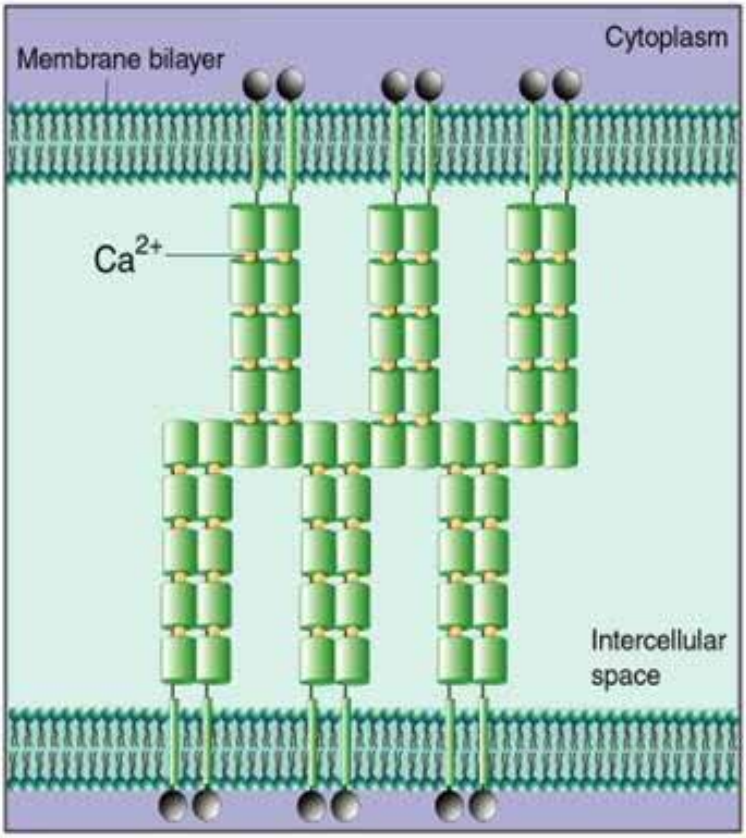


图 11-17 钙粘素结构模型

钙粘素分子结构同源性很高，其胞外部分形成 5 个结构域，其中 4 个同源，均含 Ca^{2+}结合部位（图 11-17）。决定钙粘素结合特异性的部位在靠 N 末端的一个结构域中，只要变更其中 2 个氨基酸残基即可使结合特异性由 E-钙粘素转变为 P-钙粘素。钙粘素分子的胞质部分是最高度保守的区域，参与信号转导。

钙粘素通过不同的连接蛋白质与不同的细胞骨架成分相连，如 E-钙粘素通过 α-、β-、γ-连锁蛋白（catenin）以及粘着斑蛋白（vinculin）、锚蛋白、α 辅肌动蛋白等与肌动蛋白纤维相连；桥粒中的 desmoglein 及 desmocollin 则通过桥粒致密斑

与中间纤维相连。

表 10-2 哺乳动物细胞表面的主要钙粘素分子

名称	主要分布组织
E-钙粘素	着床前的胚胎、上皮细胞（在带状粘合处特别集中）
P-钙粘素	胎盘滋养层细胞、心、肺、小肠
N-钙粘素	胚胎中胚层、神经外胚层、神经系统（脑、神经节）、心、肺
M-钙粘素	成肌细胞、骨骼肌细胞
R-粘素	视网膜神经细胞、神经胶质细胞
Ksp-钙粘素	肾
OB-钙粘素	成骨细胞
VB-钙粘素	脉管内皮细胞
desmoglein	桥粒
desmocollin	桥粒

钙粘素的作用主要有以下几个方面：

1．介导细胞连接，在成年脊椎动物，E-钙粘素是保持上皮细胞相互粘合的主要 CAM，是粘合带的主要构成成分。桥粒中的钙粘素就是 desmoglein 及 desmocollin。

2．参与细胞分化，钙粘素对于胚胎细胞的早期分化及成体组织（尤其是上皮及神经组织）的构筑有重要作用。在发育过程中通过调控钙粘素表达的种类与数量可决定胚胎细胞间的相互作用（粘合、分离、迁移、再粘合），从而通过细胞的微环境，影响细胞的分化，参与器官形成过程。

3．抑制细胞迁移，很多种癌组织中细胞表面的 E 钙粘素减少或消失，以致癌细胞易从瘤块脱落，成为侵袭与转移的前提。因而有人将 E 钙粘素视为转移抑制分子。

二、选择素

选择素（selectin）属亲异性 CAM，其作用依赖于 Ca^{2+}。主要参与白细胞与脉管内皮细胞之间的识别与粘合。已知选择素有三种：L 选择素、E 选择素及 P 选择素（图 11-18）。

选择素的胞外区由三个结构域构成：N 端的 C 型凝集素结构域，EGF 样结构域、重复次数不同的补体结合蛋白结构域；通过凝集素结构域来识别糖蛋白及糖脂分子上的糖配体。

E 选择素及 P 选择素所识别与结合的糖配体为唾液酸化及岩藻糖化的 N 乙酰氨基乳糖结构（sLeX 及 sLeA）。sLeA 结构存在于髓系白细胞表面（其中包括 L 选择素）分子中。多种肿瘤细胞表面也存在 sLeX 及 sLeA 结构。

P 选择素贮存于血小板的 α 颗粒及内皮细胞的 Weibel-Palade 小体。炎症时活化的内皮细胞表面首先出现 P 选择素，随后出现 E 选择素。它们对于召集白细胞到达炎症部位具有重要作用。

E 选择素存在于活化的血管内皮细胞表面。炎症组织释放的白细胞介素 I（IL-1）

及肿瘤坏死因子（TNF）等细胞因子可活化脉管内皮细胞，刺激 E 选择素的合成。

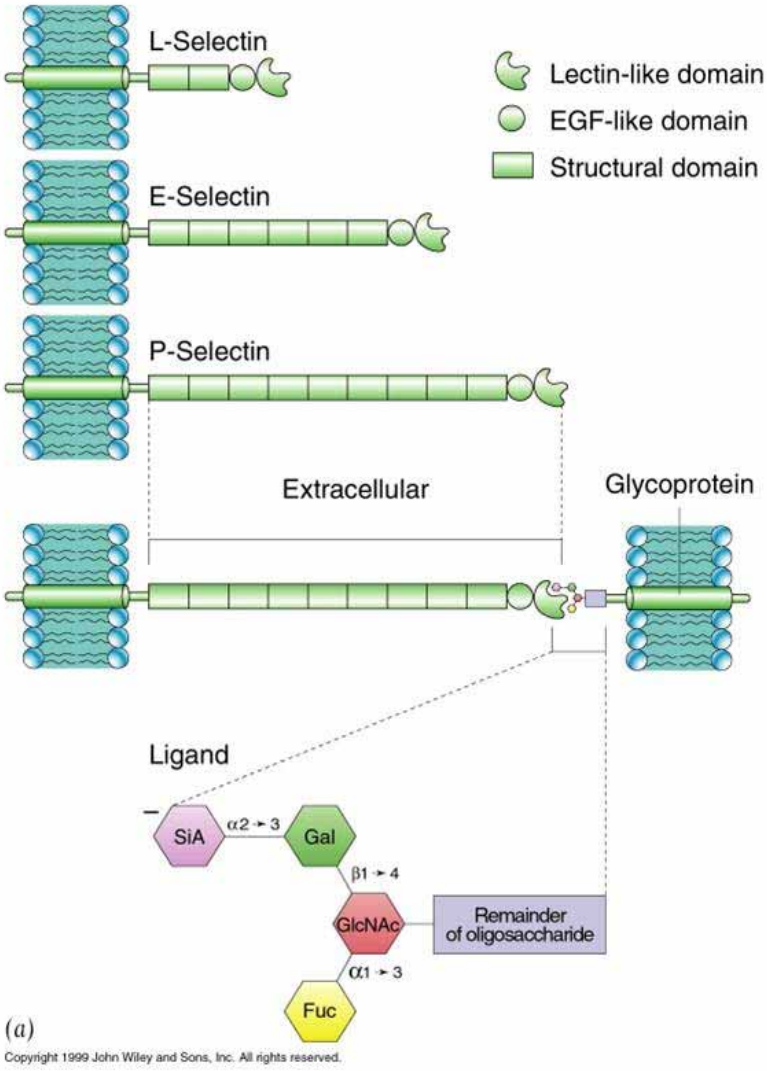


图 11-18 选择素结构模型

L 选择素广泛存在于各种白细胞的表面，参与炎症部位白细胞的出脉管过程。白细胞表面 L 选择素分子上的 sLeA 与活化的内皮细胞表面的 P 选择素及 E 选择素之间的识别与结合，可召集血液中快速流动的白细胞在炎症部位的脉管内皮上减速滚动（即通过粘附、分离、再粘附……，如此循环往复），最后穿过血管进入炎症部位。

三、免疫球蛋白超家族

免疫球蛋白超家族（Ig-superfamily，Ig-SF）包括分子结构中含有免疫球蛋白（Ig）样结构域的所有分子，一般不依赖于 Ca^{2+}。免疫球蛋白样结构域系指借二硫键维系的两组反向平行 β 折叠结构（图 11-19）。

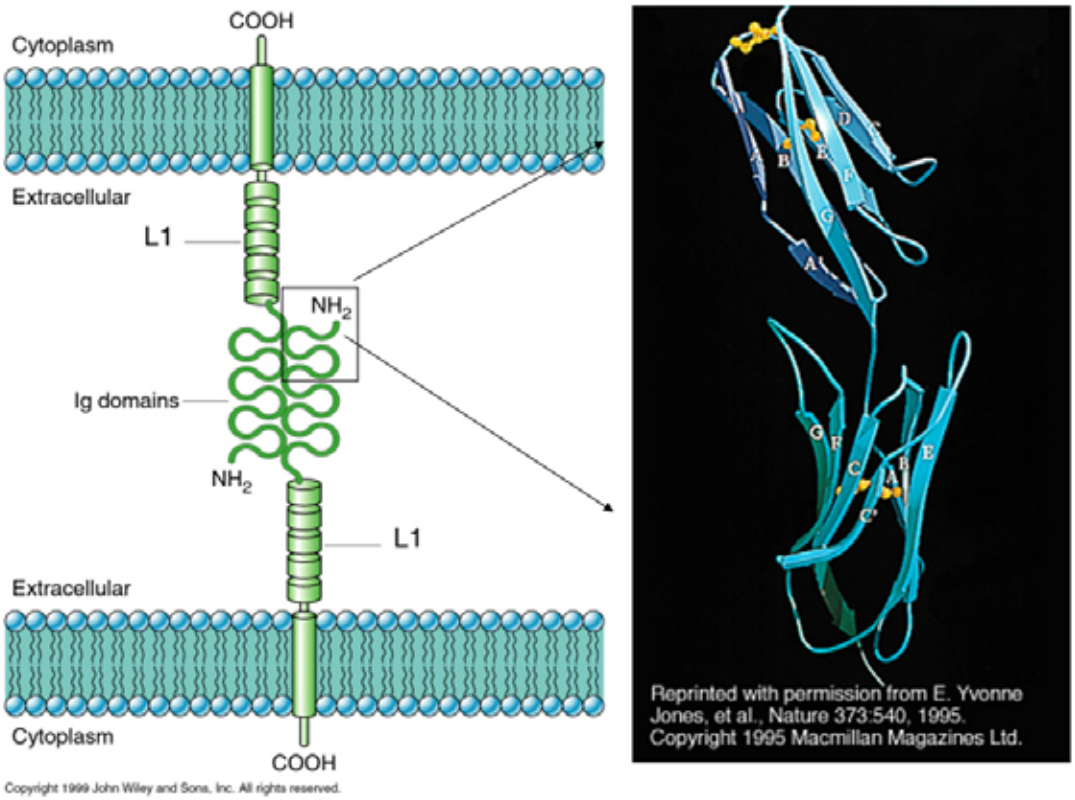


图 11-19 Ig-SF 的结构模型

除免疫球蛋白外，还包括 T 细胞受体，B 细胞受体，MHC 及细胞粘附分子（Ig-CAM）等。有的属于亲同性 CAM，如各种神经细胞粘附分子（N-CAM）及血小板-内皮细胞粘附分子（Pe-CAM）；有的属于亲异性 CAM，如细胞间粘附分子（I-CAM）及脉管细胞粘附分子（V-CAM）等。I-CAM 及 V-CAM 的配体都是整合素。

N-CAM 有 20 余种异型分子，它们在神经发育及神经细胞间相互作用上有重要作用。

I-CAM 及 V-CAM 在活化的血管内皮细胞表达。炎症时，活化的内皮细胞表面的 I-CAM 可与白细胞表面的 αLβ2 及巨噬细胞表面的 αMβ2 相结合；V-CAM 则可与白细胞的 α4β1 整合素相结合。它们继上述选择素介导的白细胞与内皮细胞的粘合作用之后使在内皮上滚动的白细胞固着于炎症部位的脉管内皮，并发生铺展，进而分泌水解酶而穿出脉管壁。

四、整合素

整合素（integrin）大多为亲异性细胞粘附分子，其作用依赖于 Ca^{2+}。介导细胞与细胞间的相互作用及细胞与细胞外基质间的相互作用（图 11-20）。几乎所有动植物细胞均表达整合素。

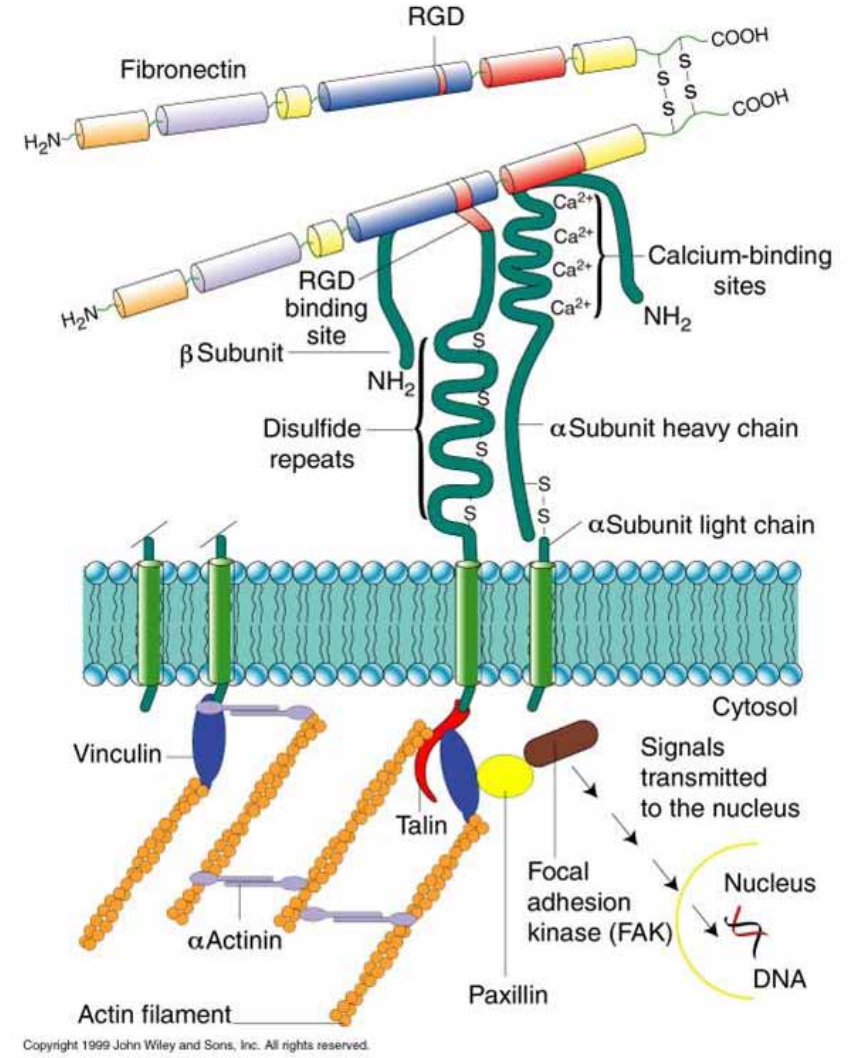


图 11-20 整合素结构模型

整合素是由 α （120~185kD）和 β（90~110kD）两个亚单位形成的异二聚体。迄今已发现 16 种 α 亚单位和 9 种 β 亚单位。它们按不同的组合构成 20 余种整合素。

α 亚单位的 N 端有结合二价阳离子的结构域，胞质区近膜处都有一个非常保守的 KXGFFKR 序列，与整合素活性的调节有关。

含 β_1 亚单位的整合素主要介导细胞与细胞外基质成分之间的粘附。含 β_2 亚单位的整合素主要存在于各种白细胞表面，介导细胞间的相互作用。β_3 亚单位的整合素主要存在于血小板表面，介导血小板的聚集，并参与血栓形成。除 β_4 可与肌动蛋白及其相关蛋白质结合，$\alpha_6\beta_4$ 整合素以层粘连蛋白为配体，参与形成半桥粒（图 11-21）。

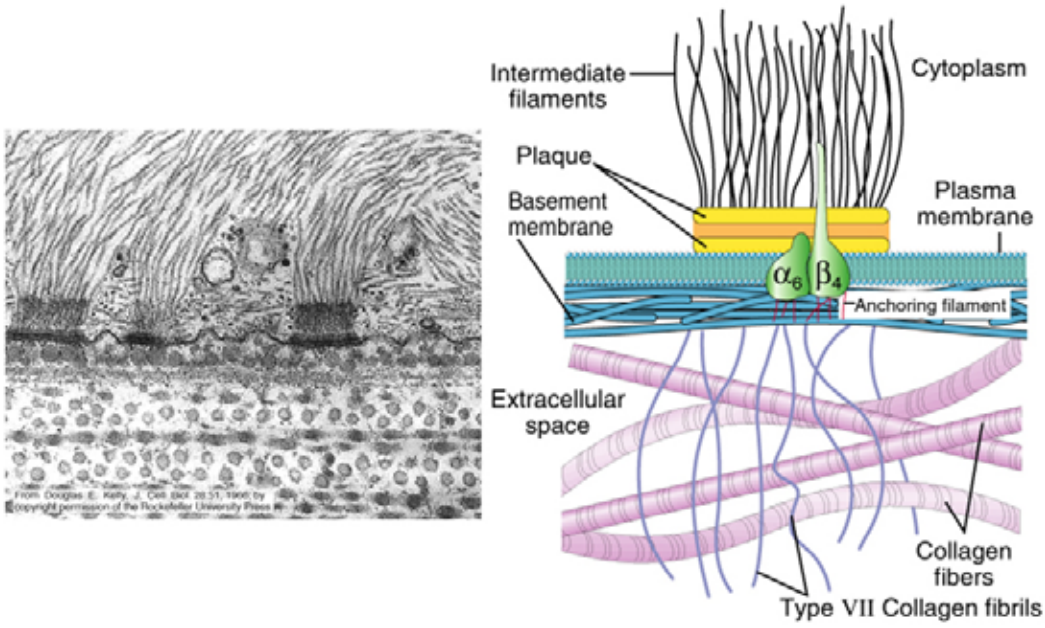


图 11-21 半桥粒处的 $\alpha_6\beta_4$ 整合素

五、透明质酸粘素

透明质酸粘素（hyaladhefin）包括可结合透明质酸糖链的一类分子，具有相似的氨基酸序列和空间构象。CD44 族是其中的一个成员，分子量范围为 85 KD~250KD，介导细胞与细胞间及细胞与细胞外基质间的相互作用，同样是由胞外，跨膜及胞质三个部分构成的糖蛋白，糖链为硫酸软骨素及硫酸乙酰肝素。CD44 肽链的 N 端可结合透明质酸，故 CD44 也被视为透明质酸的受体。

CD44 的功能包括：①与透明质酸、纤粘连蛋白及胶原结合，介导细胞与细胞外基质之间的粘附；②参与细胞对透明质酸的摄取及降解；③参与淋巴细胞归巢；④参与 T 细胞的活化；⑤促进细胞迁移。

CD44 在很多种肿瘤细胞的表达比相应正常组织为高，并与肿瘤细胞的成瘤性、侵袭性及淋巴结转移性有关。

第十二章 细胞核

1781 年 Trontana 发现于鱼类细胞，1831 年，Brown 发现于植物。成熟的植物筛管和哺乳类红细胞没有细胞核。

在原核细胞中，DNA 集中，但无核膜包围，故称拟核（nucleiod）。核一般呈圆形，但因生物的种类而异。在旺盛分裂的组织中，核呈圆形，在长形细胞中多呈椭圆形，在扁平细胞中多为扁圆形，在蛾蝶类的丝腺细胞中为分枝状，在胚乳细胞中呈网状。

细胞核的大小与细胞大小有关，最小的核直径不足 1μm，而最大的核如苏铁科某些植物卵细胞核直径可达 500-600μm。植物细胞核的直径通常在 1-4μm 左右，动物为 10μm 左右。在同一种生物，由于遗传物质的含量是恒定的，因此核的大小也比较恒定。常以核质比来估算核的大小 NP≈0.5，分裂期细胞 NP>0.5，衰老细胞 NP<0.5。

$$NP = \frac{Vn}{Vc\text{-}Vn}$$

通常一个细胞一个核，肝细胞和心肌细胞可有双核，破骨细胞可有 6-50 个细胞核，骨骼肌细胞可有数百个核；高等植物的毡绒层可有 2-4 个核。

正在生长的细胞中，核位于细胞中央，在分化成熟的细胞中，常因细胞内含物或特殊结构的存在，核被挤到边缘。

细胞核的主要结构包括：①核被膜（nuclear envelope）、②核仁（nucleolus）、③核基质（nuclear matrix）、④染色质（chromatin）、⑤核纤层（nuclear lamina）等部分（图 12-1）。

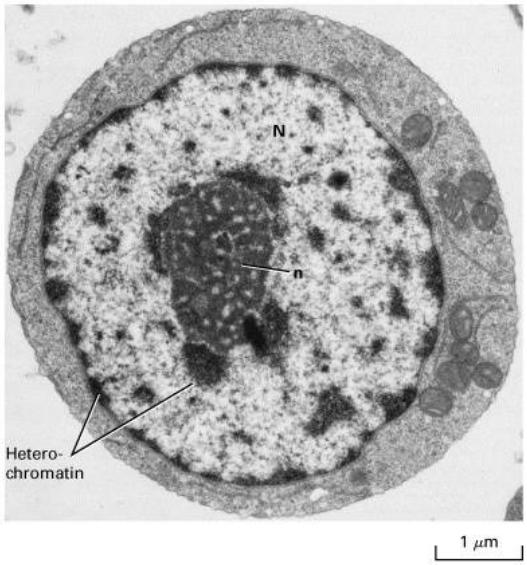


图 12-1 细胞核的结构，n 为核仁，N 为常染色质

细胞核的主要功能有两个方面：①遗传和②发育。前者表现为通过 DNA 染色体的复制和细胞分裂，维持物种的世代连续性。后者表现为通过调节基因表达的时空顺序，控制细胞的分化，完成个体发育的使命。

第一节 核被膜

是包在核外的双层膜结构。它将 DNA 与细胞质分隔开，形成核内特殊的微环境，保护 DNA 分子免受损伤；使 DNA 的复制和 RNA 的翻译表达在时空上分隔开来；此外染色体定位于核膜上，有利于解旋、复制、凝缩、平均分配到子核，核被膜还是核质物质交换的通道。

一、核被膜是双层膜结构

核被膜由内核膜（inner nuclear membrane）、外核膜（outer nuclear membrane）和核周隙（perinuclear space）三部分构成。核被膜上有核孔与细胞质相通（图 12-2、3）。

外核膜胞质面附有核糖体，并与内质网相连，核周隙与内质网腔相通，可以说是内质网的一部分。外核膜上附着 10nm 的中间纤维 intermediate filament，可见核是被内质网和中间纤维相对固定的。

核周隙宽 20-40nm，腔内电子密度低，一般不含固定的结构。

内核膜的内表面有一层网络状纤维蛋白质，叫核纤层（nuclear lamina），可支持核膜（图 12-3、4）。

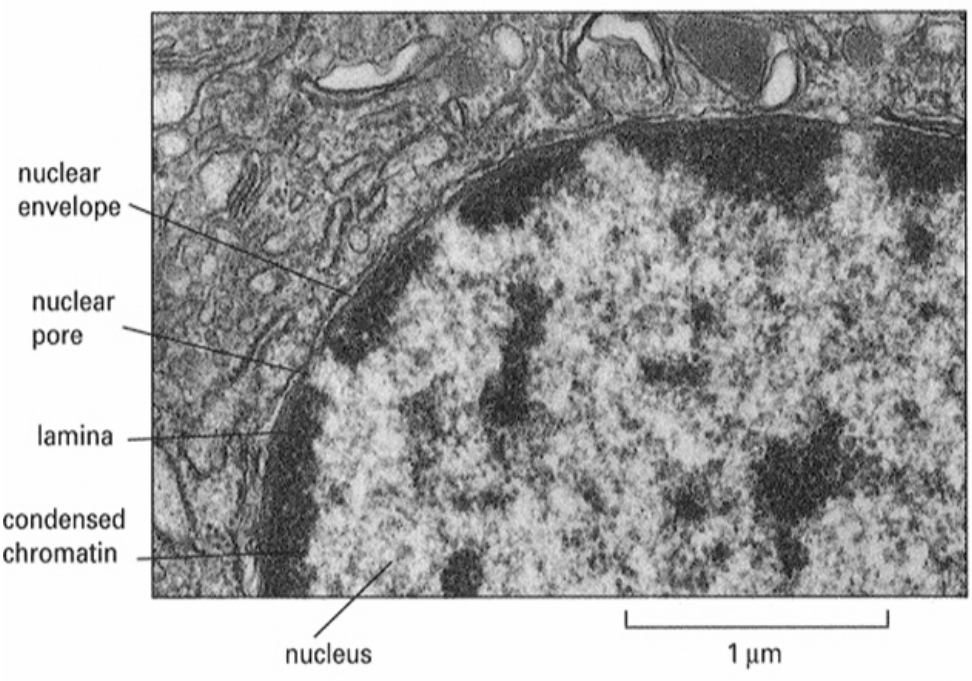


图 12-2 核被膜的 TEM 照片

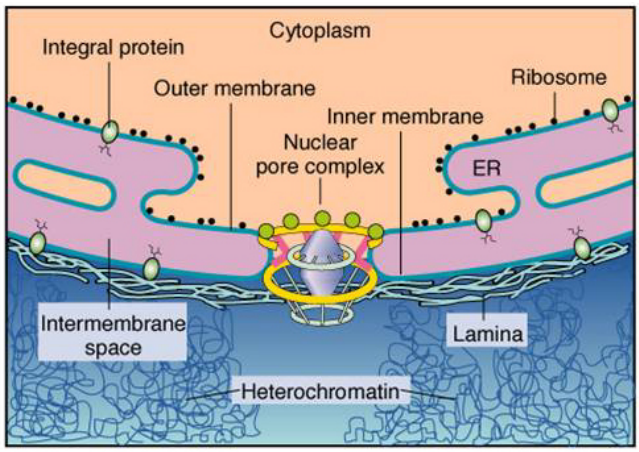


图 12-3 核被膜的结构

核纤层由核纤肽（lamin）构成，核纤肽分子量约 60-80KD，是一类中间纤维，在哺乳类和鸟类中可分为 A、B 两型。

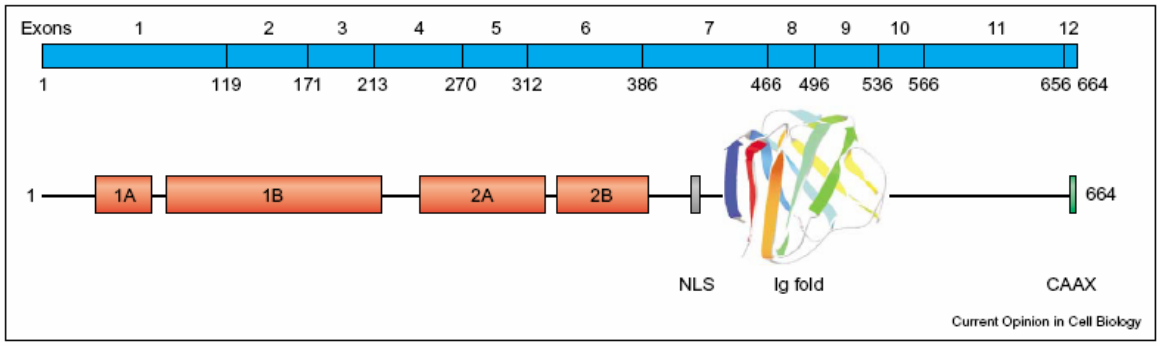


图 12-4a A 型核纤肽的结构

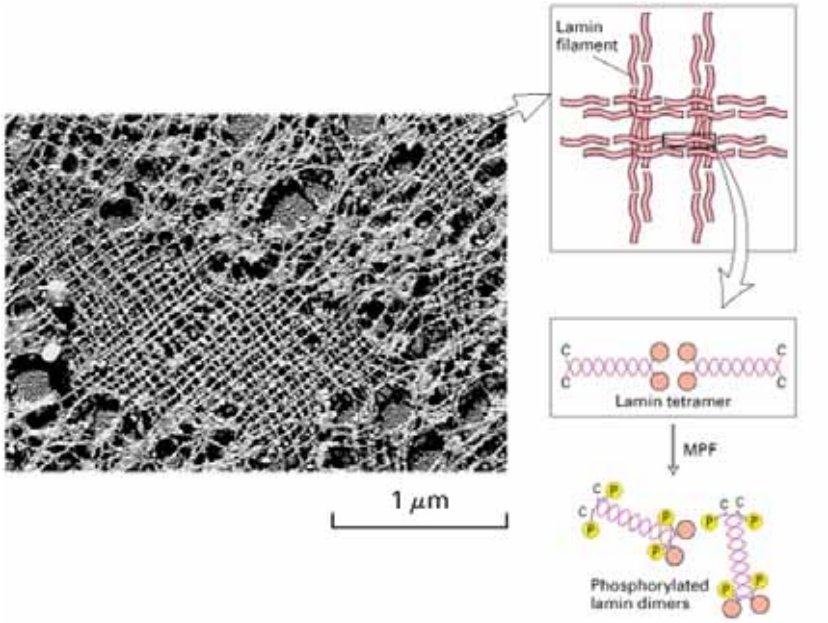


图 12-4b 核纤层结构

核纤层的作用有以下两个方面：

1．保持核的形态：是核被膜的支架，用高盐溶液、非离子去污剂和核酸酶去除大部分核物质，剩余的核纤层仍能维持核的轮廓。此外，核纤层与核骨架以及穿过核被膜的中间纤维相连，使胞质骨架和核骨架形成一连续网络结构。

2．参与染色质和核的组装：核纤层在细胞分裂时呈现出周期性的变化，在间期核中，核纤层提供了染色质（异染色质）在核周边锚定的位点。在前期结束时，核纤层被磷酸化，核膜解体。其中 B 型核纤肽与核膜残余小泡结合，A 型溶于胞质中。在分裂末期，核纤肽去磷酸化重新组装，介导了核膜的重建。

二、核孔是物质运输的通道

核孔是细胞核与细胞质之间物质交换的通道，一方面核的蛋白都是在细胞质中合成的，通过核孔定向输入细胞核，另一方面细胞核中合成的各类 RNA、核糖体亚单位需要通过核孔运到细胞质。此外注射实验证明，小分子物质能够以自由扩散的方式通过核孔进入细胞核。

核孔由至少 50 种不同的蛋白质（nucleoporin）构成，称为核孔复合体（nuclear pore complex，NPC）。一般哺乳动物细胞平均有 3000 个核孔。细胞核活动旺盛的细胞中核孔数目较多，反之较少。如蛙卵细胞每个核可有 $37.7X10^6$ 个核孔，但其成熟后细胞核仅 150-300 个核孔。

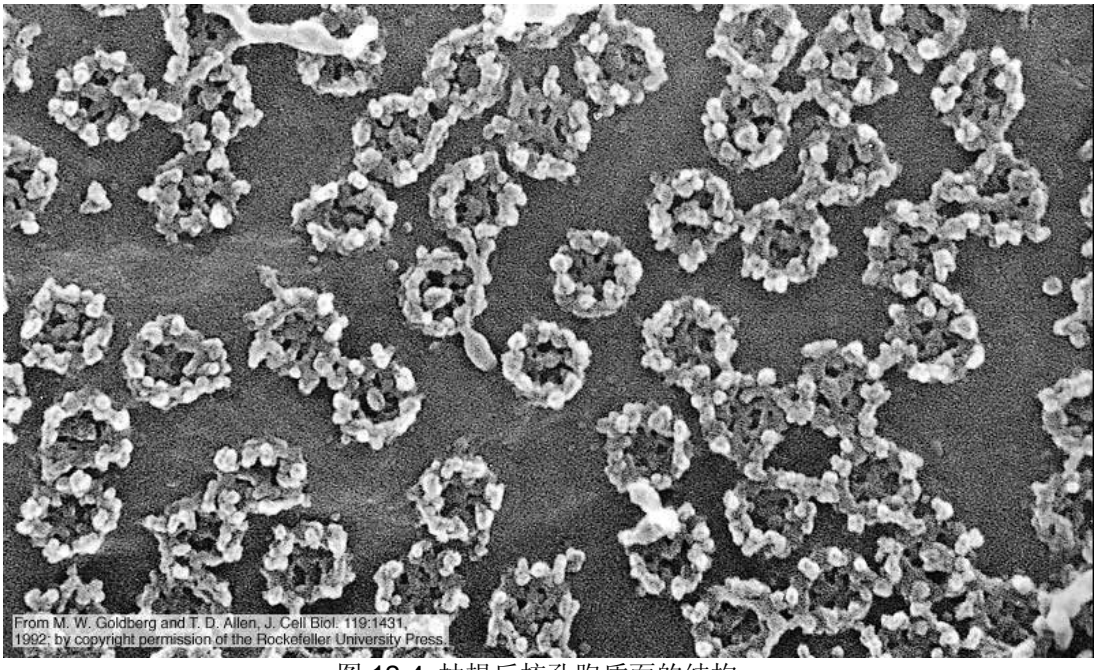


图 12-4 抽提后核孔胞质面的结构

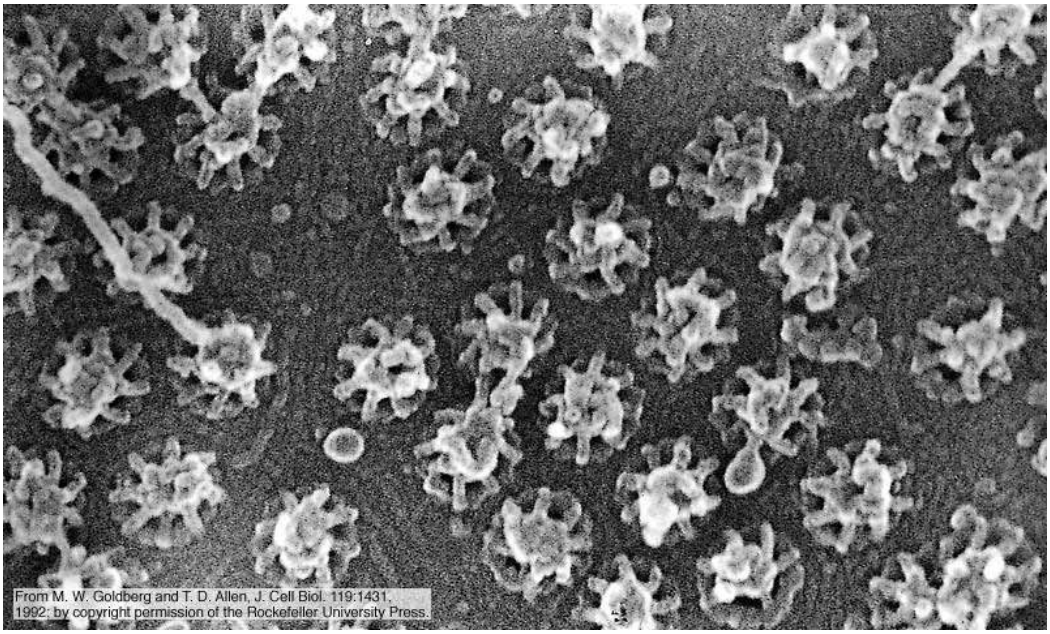


图 12-5 抽提后核孔核质面的结构

在电镜下观察，核孔是呈圆形或八角形（图 12-4、5），一般认为其结构如 fish-trap，主要包括以下几个部分：①胞质环（cytoplasmic ring），位于核孔复合体胞质一侧，环上有 8 条纤维伸向胞质；②核质环（nuclear ring），位于核孔复合体核质一侧，上面伸出 8 条纤维，纤维端部与端环相连，构成笼子状的结构；③转运器（transporter），核孔中央的一个栓状的中央颗粒；④辐（Spoke）：核孔边缘伸向核孔中央的突出物（图 12-6）。

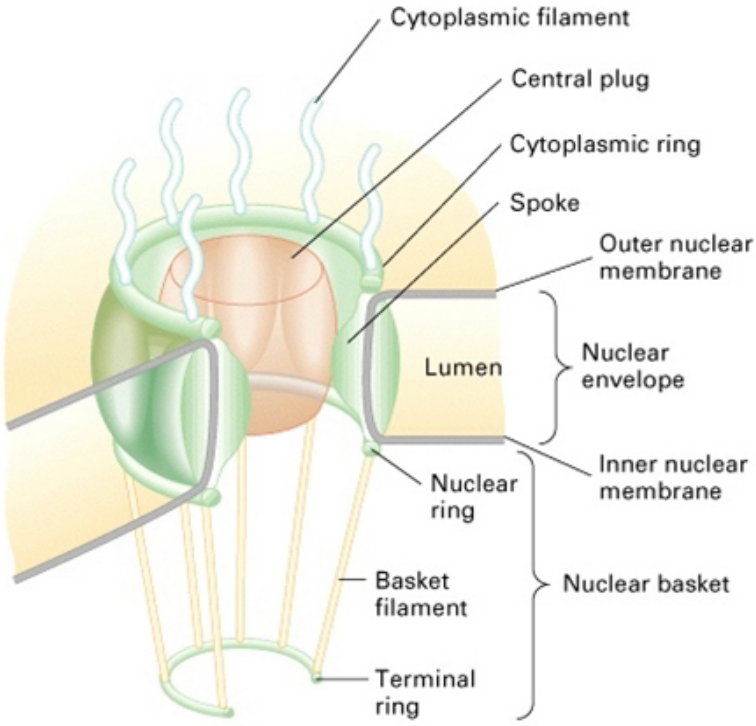


图 12-6 核孔结构模型

三、通过核孔的物质运输与信号序列有关

1982 年 R. Laskey 发现核内含量丰富的核质蛋白（nucleoplasmin）的 C 端有一个信号序列，可引导蛋白质进入细胞核（图 12-7），称作核定位信号（nuclear localization signal，NLS）。第一个被确定的 NLS 是病毒 SV40 的 T 抗原，它在胞质中合成后很快积累在核中。其 NLS 为：pro-pro-lys-lys-lys-Arg-Lys-val，即使单个氨基酸被替换，亦失去作用。

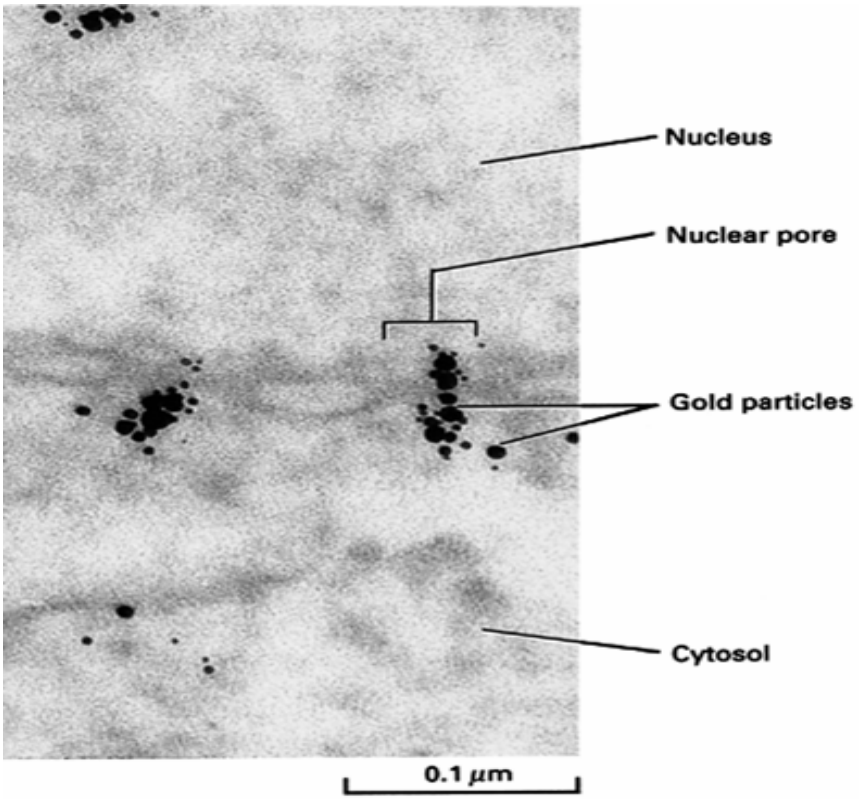


图 12-7 金标记的核质素穿越核孔

NLS 由 4-8 个氨基酸组成，含有 Pro、Lys 和 Arg。对其连接的蛋白质无特殊要求，并且完成核输入后不被切除。

Karyopherin 是一类与核孔选择性运输有关的蛋白家族，相当于受体蛋白。其中 imporin 负责将蛋白从细胞质运进细胞核，exportin 负责相反方向的运输。

通过核孔复合体的转运还涉及 Ran 蛋白，Ran 是一种 G 蛋白，调节货物受体复合体的组装和解体，在细胞核内 Ran-GTP 的含量远高于细胞质。

核质蛋白向细胞核的输入可描述如下：①蛋白与 NLS 受体，即 imporin α/β 二聚体结合；②货物与受体的复合物与 NPC 胞质环上的纤维结合；③纤维向核弯曲，转运器构象发生改变，形成亲水通道，货物通过；④货物受体复合体与 Ran-GTP 结合，复合体解散，释放出货物；⑤与 Ran-GTP 结合的 imporin β，输出细胞核，在细胞质中 Ran 结合的 GTP 水解，Ran-GDP 返回细胞核重新转换为 Ran-GTP；⑥imporin α 在核内 exportin 的帮助下运回细胞质（图 12-8）。

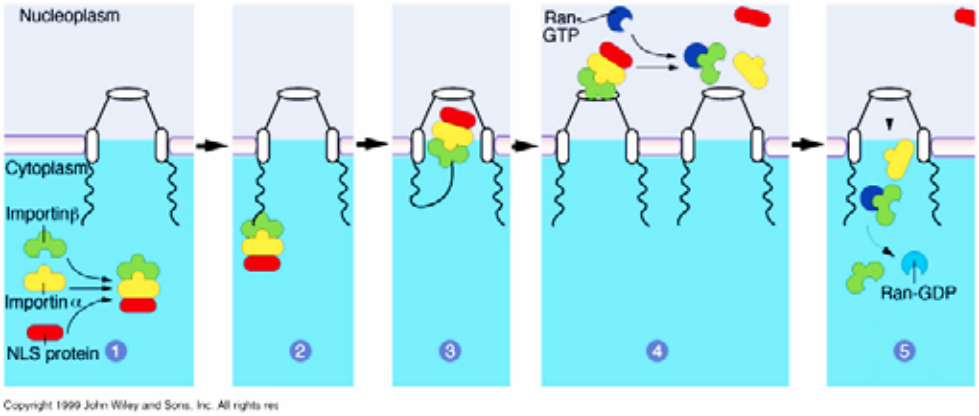


图 12-8 核质素输入细胞核的过程

对细胞核向细胞质的大分子输出了解较少，大多数情况下，细胞核内的 RNA 是与蛋白质形成 RNP 复合物转运出细胞核的。RNP 的蛋白质上具有核输出信号（nuclear export signal, NES），可与细胞内的受体 exportin 结合，形成 RNP-exportin-Ran-GTP 复合体，输出细胞核后，Ran-GTP 水解，释放出结合的 RNA，Ran-GDP、exportin 和 RNP 蛋白返回细胞核。

第二节 染色体

1848 年，Hofmeister 从鸭跖草的小孢子母细胞中发现染色体。

1888 年，Waldeyer 正式定名为 Chromosome。

1879 年，W. Flemming 提出了染色质（chromatin）这一术语，用以描述染色后细胞核中强烈着色的细丝状物质。

后来的研究证明染色质和染色体是同一物质在不同细胞周期中的形态表现。

一、染色质的化学组成

染色质由 DNA、组蛋白、非组蛋白及少量 RNA 组成，比例为 1：1：（1-1.5）：0.05。可见 DNA 与组蛋白的含量比较恒定，非组蛋白的含量变化较大，RNA 含量最少。

（一）DNA

DNA 是遗传信息的携带者，DNA 的序列可分为 3 种类型，即：单一序列、中度重复序列（10^{1-5}）和高度重复序列（$>10^5$）。DNA 的二级结构存在 3 种主要类型，即：B-DNA、Z-DNA、A-DNA（图 12-9）。

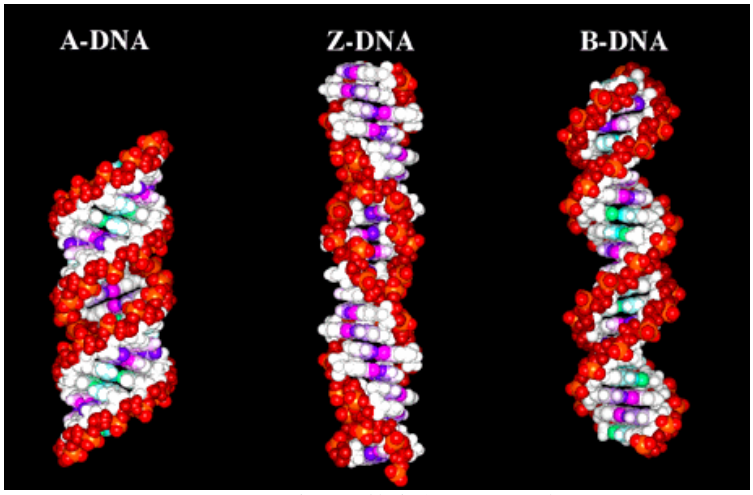


图 12-9 三种不同构象的 DNA 双螺旋

染色体具有 3 个基本元素（图 12-10）：①自主复制序列(autonomously replicating DNA sequence, ARS)，是 DNA 复制的起点，酵母基因组含 200-400 个 ARS，大多数具有一个 11bp 富含 AT 的一致序列（ARS consensus sequence, ACS）；②着丝粒序列(centromere DNA sequence,CEN) ，由大量串联的重复序列组成，如 α 卫星 DNA，其功能是参与形成着丝粒，使细胞分裂中染色体能够准确地分离；③端粒序列(telomere DNA sequence,TEL) ，不同生物的端粒序列都很相似，由长 5-10bp 的重复单位串联而成，人的重复序列为 GGGTTA。

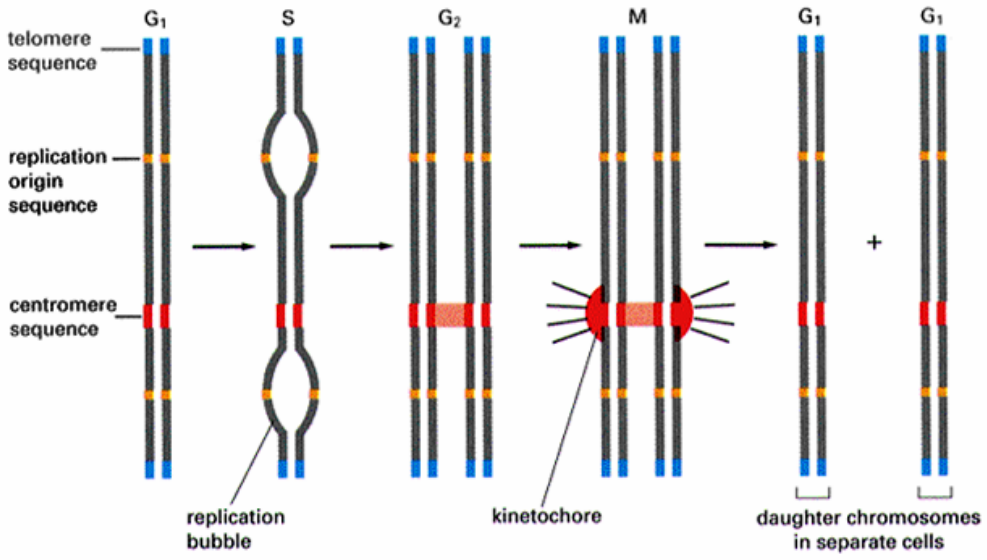


图 12-10 染色体的三种基本序列

1983 年，A. W. Murray 等人首次成功构建了包括 ARS、CEN、TEL 和外源 DNA，总长度为 55kb 的酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC)。YAC 可用于转基因和构建基因文库，容纳插入片段的能力远高于质粒。

（二）组蛋白

组蛋白带正电荷，含精氨酸，赖氨酸，属碱性蛋白，其含量恒定，在真核细胞中组蛋白共有 5 种，分为两类：

一类是高度保守的核心组蛋白（core histone）包括 H_2A、H_2B、H_3、H_4 四种；另一类是可变的连接组蛋白（linker histone）即 H_1。

核心组蛋白的结构是非常保守，特别是 H_4，牛和豌豆 H_4 的 102 个氨基酸中仅有 2 个不同，而进化上两者分岐的年代约 3 亿年历史。核心组蛋白高度保守的原因可能有两个：其一是核心组蛋白中绝大多数氨基酸都与 DNA 或其它组蛋白相互作用，可置换而不引起致命变异的氨基酸残基很少；其二是在所有的生物中与组蛋白相互作用的 DNA 磷酸二脂骨架都是一样的。

四种核心组蛋白均由球形部和尾部构成，球形部借精氨酸残基与磷酸二脂骨架间的静电作用使 DNA 分子缠绕在组蛋白核心周围，形成核小体。尾部则含有大量赖氨酸和精氨酸残基，为组蛋白翻译后进行修饰的部位，如乙酰化、甲基化、磷酸化等。

H_1 不仅具有属特异性，而且还有组织特异性，所以 H_1 是多样性的。

（三）非组蛋白

与组蛋白不同，非组蛋白是染色体上与特异 DNA 序列结合的蛋白质，所以又称序列特异性 DNA 结合蛋白，非组蛋白的特性是：①含有较多的天门冬氨酸、谷氨酸，带负电荷，属酸性蛋白质；②整个细胞周期都进行合成，不象组蛋白只在 S 期合成，并与 DNA 复制同步进行；③能识别特异的 DNA 序列，识别信息存在于 DNA 本身，位点在大沟部分，识别与结合籍氢键和离子键。

非组蛋白的功能是：①帮助 DNA 分子折叠，以形成不同的结构域，从而有利于 DNA 的复制和基因的转录；②协助启动 DNA 复制；③控制基因转录，调节基因表达。

二、从 DNA——到染色体

人体的一个细胞核中有 23 对染色体，每条染色体的 DNA 双螺旋若伸展开，平均长为 5cm，核内全部 DNA 连结起来约 1.7-2.0m，而细胞核直径不足 10um。因此，不难想象 DNA 是以螺旋和折叠的方式压缩起来的，压缩比例高达上万倍，这种压缩的最初级结构就是核小体。

用非特异性核酸酶（如微球菌核酸酶）处理染色质，大多数情况下可得到大约 200bp 的片段，但处理裸露的 DNA 分子会得到随机降解的片段。以这个实验为基础，R. Kornberg 建立了核小体模型。

核小体是一种串珠状结构，由核心颗粒和连结线 DNA 两部分组成，可描述如下（图 12-11）：①每个核小体单位包括约 200bp 的 DNA、一个组蛋白核心和一个 H_1；

②由 H_1A、H_2B、H_3、H_4 各两分子形成八聚体，构成核心颗粒；③DNA 分子以左手螺旋缠绕在核心颗粒表面，每圈 80bp，共 1.75 圈，约 146Kb，两端被 H_1 锁合；④相邻核心颗粒之间为一段 60bp 的连接线 DNA。

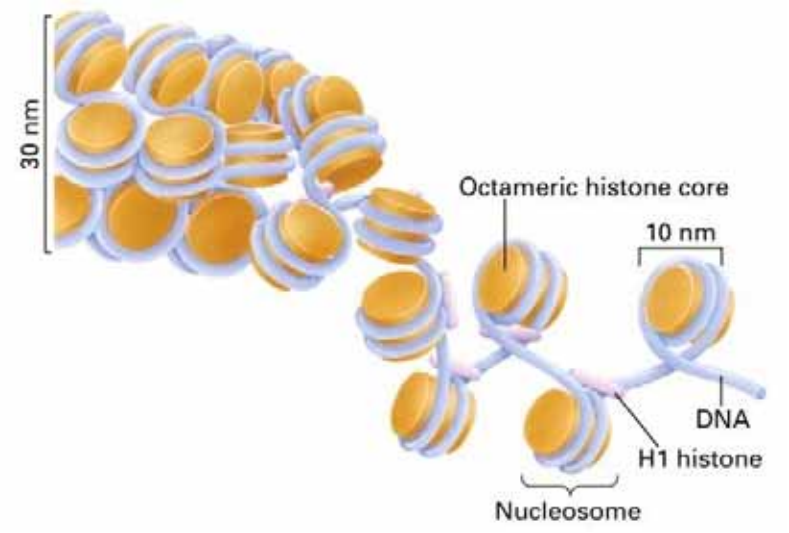


图 12-11 核小体和螺线管的结构

通过核小体，DNA 长度压缩了 7 倍，形成直径为 11nm 的纤维(图 12-12)。但是染色质不以这种状态存在，在电镜下观察用温和方法分离的染色质是直径 30nm 的纤维，这种纤维的形成有两种解释：①由核小体螺旋化形成，每 6 个核小体绕一圈，构成外径 30nm 的中空管（图 12-12），长度压缩 6 倍；②由核小体纤维 Z 字形折叠而成，长度压缩 40 倍。30nm 纤维的形成与核小体之间蛋白质的相互作用有关，连接组蛋白 H_1 和核心组蛋白尾部均参与这种相互作用，去除组蛋白 H_1 的染色质中，30nm 纤维解体为更细的纤维。

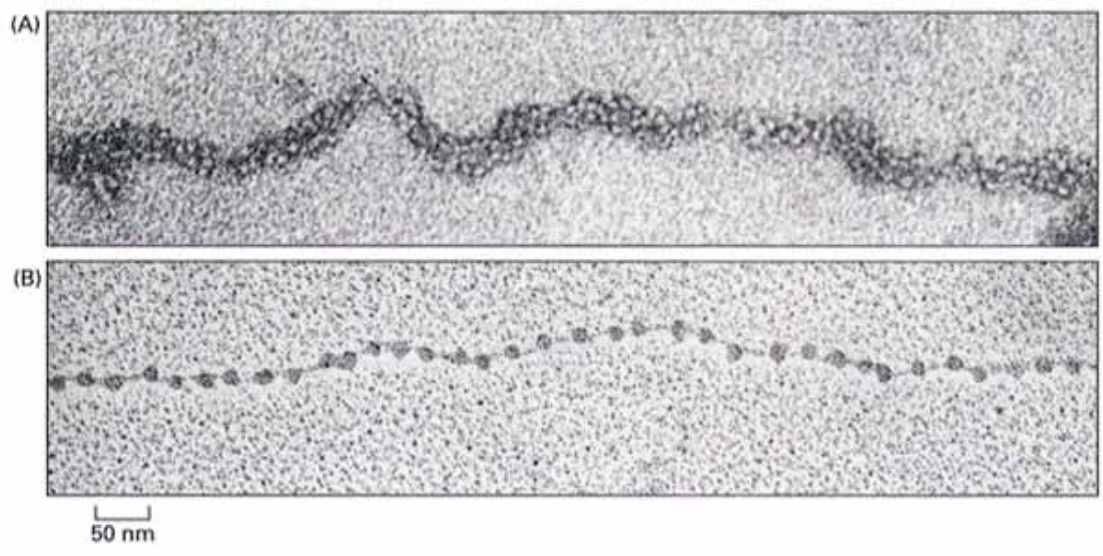


图 12-12 30nm 和 11nm 染色质纤维

对于更高级染色体包装方式，至今尚不明确。目前多认为 30nm 的纤维折叠为一系列的环（loop）结合在核骨架上（或称染色体骨架），结合点是富含 AT 的区域

（图 12-13），这种环状的结构散布于细胞核中。用盐溶液去除组蛋白，在电镜下可以看到，无论有丝分裂的染色体、灯刷染色体、间期的唾腺染色体上，都有大量的结合在骨架上的放射环，说明这种环并不是有丝分裂染色体所特有的。

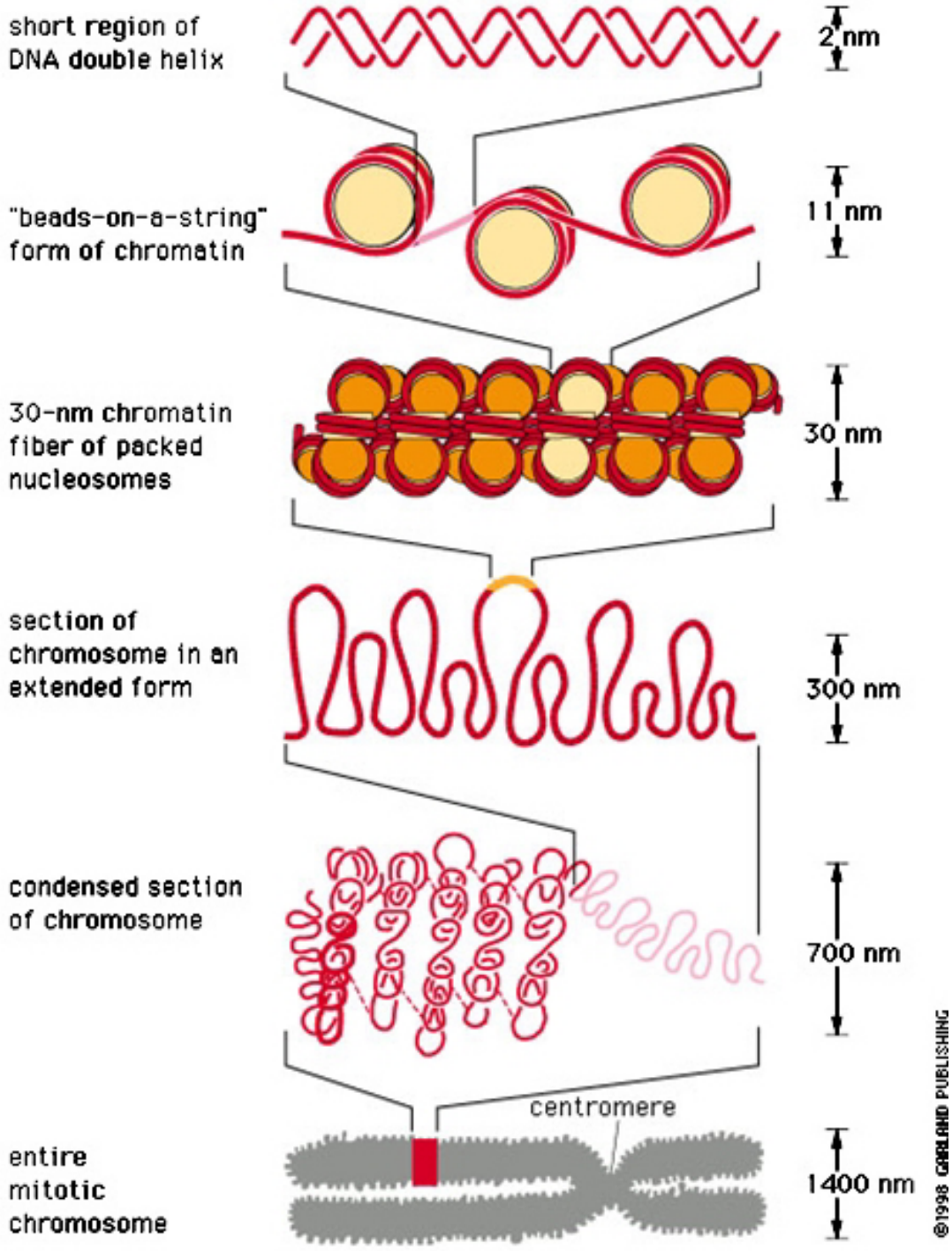


图 12-13 染色体的包装方式

三、异染色质和常染色质

间期核中染色质可分为异染色质（heterochromatin）和常染色质（euchromatin）。常染色质是进行活跃转录的部位，呈疏松的环状，电镜下表现为浅染（图 12-14）；易被核酸酶在一些敏感的位点（hypersensitive sites）降解。异染色质的特点是：在间期核中处于凝缩状态，无转录活性，也叫非活动染色质(inactive chromatin)，是遗传惰性区；在细胞周期中表现为晚复制、早凝缩，即异固缩现象(heteropycnosis)。

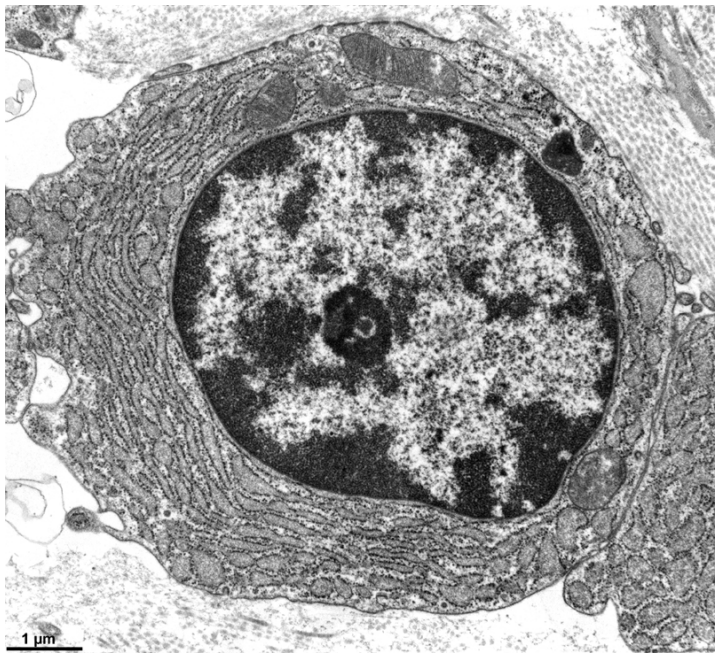


图 12-14 异染色质（核内深染部分）和常染色质（核内浅染部分）

结构（恒定）异染色质（constitutive heterochromatin）：在所有细胞内和都呈异固缩的染色质，多定位于着丝粒区（图 12-15），端粒，次缢痕及染色体臂的某些节段，在间期聚集成多个染色中心（chromocenter），由相对简单的高度重复序列构成。

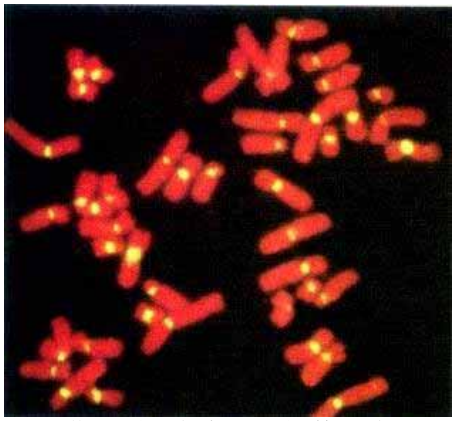


图 12-15 荧光原位杂交显示的着丝粒卫星 DNA

兼性（功能）异染色质（facultative heterochromatin）：是指不同细胞类型或不同发育时期出现的异染色质区。雌性哺乳类动物的 X 染色体就是一类特殊的兼性异染色质。在哺乳动物细胞内如有两个 X 染色体（通常为雌性），则其中的一个染色体常表现为异染色质（图 12-16），称巴氏小体（barr body）。人的胚胎发育到 16 天以后，一条 X 染色体转变为巴氏小体，呈块状紧靠核膜，染色反应表现为深染。因此通过检查羊水中胚胎细胞的巴氏小体可预测胎儿的性别。

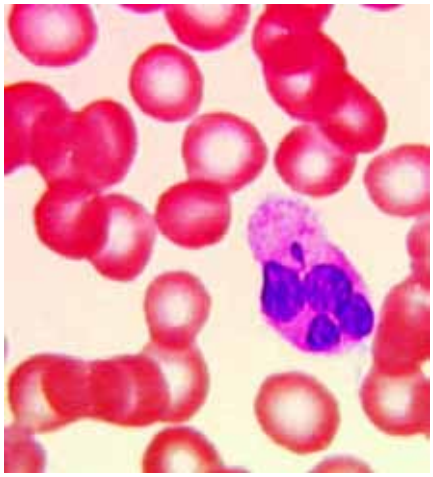


图 12-16 白细胞中的巴氏小体（鼓槌状结构）

四、染色体结构

间期染色质分散于细胞核，但在分裂期，染色质通过盘旋折叠压缩近万倍，包装成大小不等、形态各异的短棒状染色体。中期染色体由于形态比较稳定是观察染色体形态和计数的最佳时期。

同一物种的染色体数目是相对稳定的，性细胞染色体为单倍体（haploid），用 n 表示，体细胞为 2 倍体（diploid）以 2n 表示，还有一些物种的染色体成倍增加成为 4n、6n、8n 等，称为多倍体。同一个体的体细胞并非都是 2 倍体，如大鼠肝细胞有 4n、8n、16n 等多倍体细胞，果蝇卵巢滋养细胞表现为 2n、4n、8n、16n、32n、64n、128n 等不同倍性，人类子宫内膜细胞的染色体数目变化在 2n=17-103，为非整倍性。

染色体的数目因物种而异，如人类 2n=46，黑猩猩 2n=48，果蝇 2n=8，家蚕 2n=56，小麦 2n=42，水稻 2n=24，洋葱 2n=16。在植物中染色体最少的是一种菊科植物 *Haplopapus gracillis* 仅 2 对染色体，最多的是瓶尔草属 *phioglossum* 的一些物种，可达 400-600 对。在动物中染色体最少的是一种介壳虫的雄虫 *steatococcus tuberculatus* 仅有两条染色体，而另一极端是一种灰蝶有 217-223 对染色体。

（一）染色体形态和结构相关的术语（图 12-17）

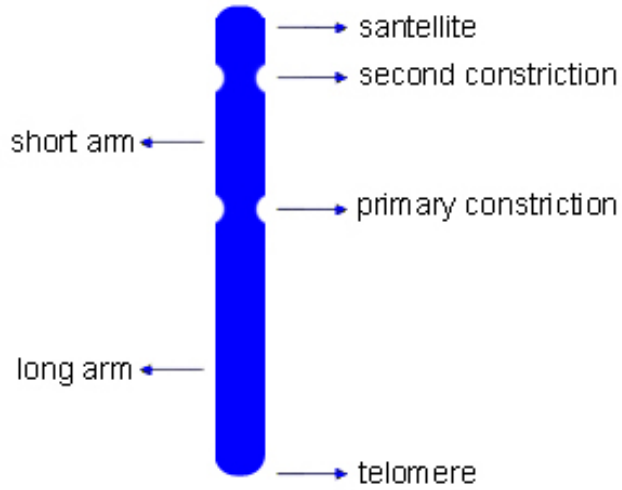


图 12-17 染色体各部分的名称

1．染色单体（Chromatid）：中期染色体由两条染色单体组成，两者在着丝粒的部位相互结合，每一条染色单体是由一条 DNA 双链经过螺旋和折叠而形成的，到后期，着丝粒分裂，两条染色单体分离。

2．染色线（Chromonema）：前期或间期核内的染色质细线，代表一条染色单体。

3．染色粒（Chromomere）：前期染色体上呈线性排列的念珠状颗粒，是 DNA 局部收缩形成的，异染色质的染色粒一般较大，而常染色粒的染色粒较小，在染色体上位于着丝粒两边的染色粒一般较大，而向染色体端部的染色体较小，呈梯度排列。

4．主缢痕（primary constriction）：中期染色体上一个染色较浅而缢缩的部位，主缢痕处有着丝粒，所以亦称着丝粒区，由于这一区域染色线的螺旋化程序低，DNA 含量少，所以染色很浅或不着色。一般动植物的染色体具有一个位置固定的着丝粒(localized contromere)，有些生物整过染色体都具有着丝粒活性，称为全着丝粒（holocentromere）如：如蛔虫、线虫、蝶、蛾、蚜虫等。可根据着丝粒的位置将染色体分为 4 类：即①中着丝粒染色体（metacentric chromosome）。②亚中着丝粒染色体（submetacentric chromosome）。③亚端着丝粒染色体（subtelocentric chromosome）和④端着丝粒染色体（telocentric chromosome）。划分的标准有：①臂比值 r（长臂长/短臂长），②着丝粒指数 i[(短臂长/染色体长)×100%]， ③短臂长臂比等 3 种。

5．次缢痕（secondary constriction）：除主缢痕外，染色体上第二个呈浅缢缩的部分称次缢痕，次缢痕的位置相对稳定，是鉴定染色体个别性的一个显著特征。

6．核仁组织区（nucleolar organizing regions NORs）：是核糖体 RNA 基因所在的区域（图 12-18），其精细结构呈灯刷状。能够合成核糖体的 28S、18S 和 5.8S rRNA。核仁组织区位于染色体的次缢痕区，但并非所有的次缢痕都是 NORs。

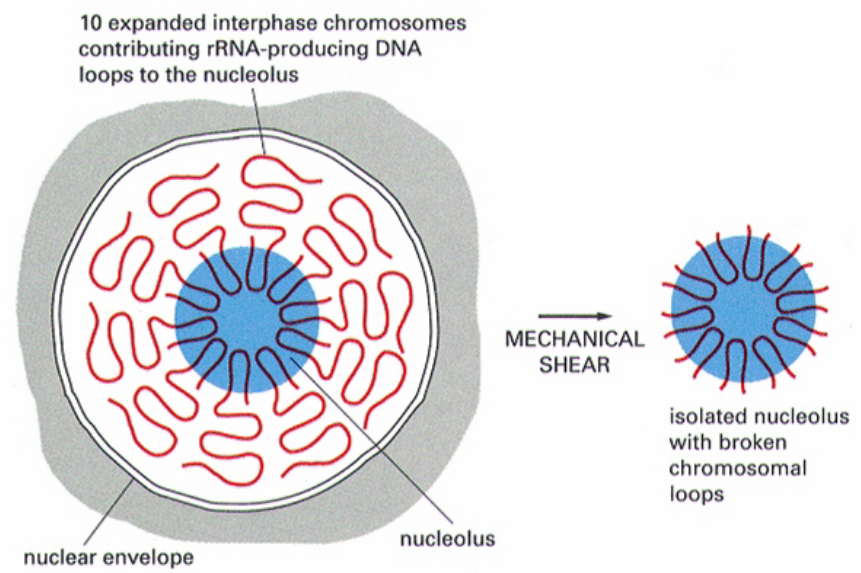


图 12-18 核仁组织者中心形成核仁

7．随体（satellite）：指位于染色体末端的球形染色体节段，通过次缢痕区与染色体主体部分相连。位于染色体末端的随体称为端随体，位于两个次缢痕中间的称中间随体。

8．端粒（telomere）：是染色体端部的特化部分（图 12-19），其生物学作用在于维持染色体的稳定性。如果用 X 射线将染色体打断，不具端粒的染色体末端有粘性，会与其它片段相连或两端相连而成环状。端粒由高度重复的短序列串联而成，在进化上高度保守，不同生物的端粒序列都很相似，人的序列为 GGGTTA。端粒起到细胞分裂计时器的作用，端粒核苷酸复制和基因 DNA 不同，每复制一次减少 50-100bp，其复制要靠具有反转录酶性质的端粒酶（telomerase）来完成，正常体细胞缺乏此酶，故随细胞分裂而变短，细胞随之衰老。

Species	Telomere repeat sequence	Telomerase RNA template sequence
Human	TTAGGG	CUAACCCUAAC
Tetrahymena	TTGGGG	CAACCCCAA
Arabidopsis	TTTAGGG	CUAAACCCUAAAC

图 12-19 荧光原位杂交显示的端粒（上）和端粒序列（下）

（二）着丝粒的结构

着丝粒（centromere）和着丝点（kinetochore）是两个不同的概念，前者指中期染色单体相互联系在一起的特殊部位，后者指主缢痕处两个染色单体外侧表层部位的特殊结构，它与纺锤体微管相接触。

着丝粒含 3 个结构域（图 12-20），即：着丝点结构域（kinetochore domain）、中心结构域（central domain）和配对结构域（paring domain）。

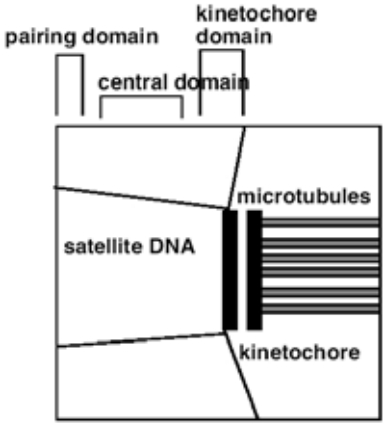


图 12-20 着丝粒的 3 个结构域

着丝点结构域（图 12-21）：位于着丝粒的表面，由外板（outer plate）、内板（inner plate）、中间区（interzone）和围绕外层的纤维冠(fibrous corona)。内外板的电子密度高，中间区电子密度低。内板与中央结构域的着丝粒异染色质结合，外板与微管纤维结合，纤维冠上结合有马达蛋白，如胞质 Dynein 和属于 kinesin 家族的 CENP-E，为染色体的分离提供动力。

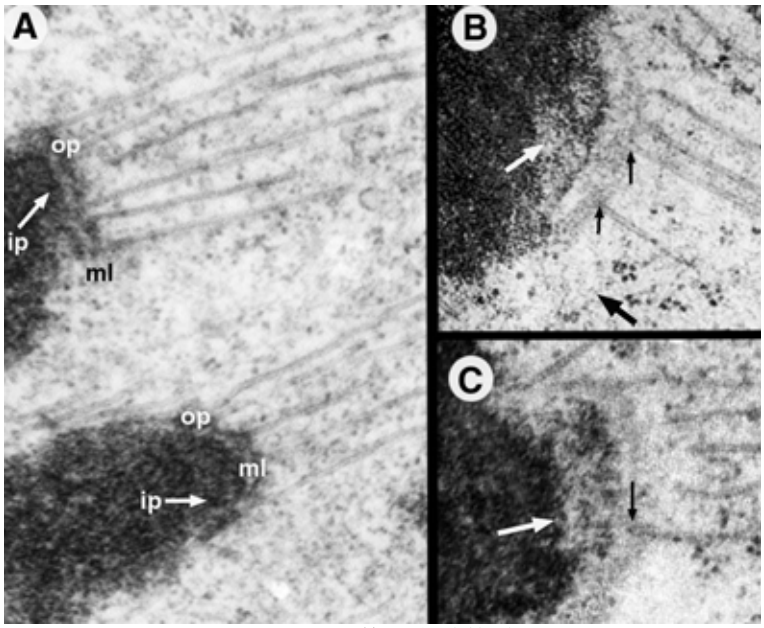


图 12-21 着丝点结构域

中央结构域：位于着丝粒结构域的下方，含有高度重复的 α 卫星 DNA 构成的异染色质。

配对结构域：位于着丝粒结构的内层，中期两条染色单体在此处相互连结，在此区域发现有两类蛋白，一类为内着丝粒蛋白 INCENP（inner centromere protein），另一类为染色单体连接蛋白 CLIP（chromatid linking protein）。

对于着丝粒蛋白研究主要是使用 ACA 来研究的。ACA 是从 CREST 综合症病人血清中分离出来的抗着丝粒蛋白的抗体(anticentromere antibodies)。用 ACAs 发现鉴定出来的 CENP 主要有 6 种，即：CENP-A 至 F（表 12-1）。

表 12-1 几种着丝粒蛋白质的功能

类型	功能
CENP-A	着丝粒特异性组蛋白
CENP-B	与中央结构域的卫星 DNA 结合
CENP-C	与着丝点结合
CENP-D	与着丝点结合
CENP-E	驱动蛋白类分子马达
CENP-F	与着丝点结合
INCENP-A	连接姊妹染色单体
INCENP-B	连接姊妹染色单体

（三）核型与带型

早期对染色体的研究主要采用组织切片的方法，由于染色体经常不处于同一平面，因此很难对染色体进行观察和计数，以致于对人类到底有多少条染色体这样的问题一直争论到 1956 年才得以确认，这主要归功于 50 年代以后逐步发展起来的低渗处理，压片技术以及秋水仙来处理和细胞培养技术。二十世纪六十年代末至七十年代发展起来的各种染色体分带技术，使染色体的研究进入了一个黄金时代。为人类遗传病的鉴定，物种的血缘关系与进化研究、遗传育种等方面提供了重要的依据。

核型（karyotype）是细胞分裂中期染色体特征的总和，包括染色体的数目、大小和形态特征等方面。如果将成对的染色体按形状、大小依顺序排列起来叫核型图(karyogram, 图 12-22)，而染色体组型 idiogram 通常指核型的模式图，代表一个物种的模式特征。

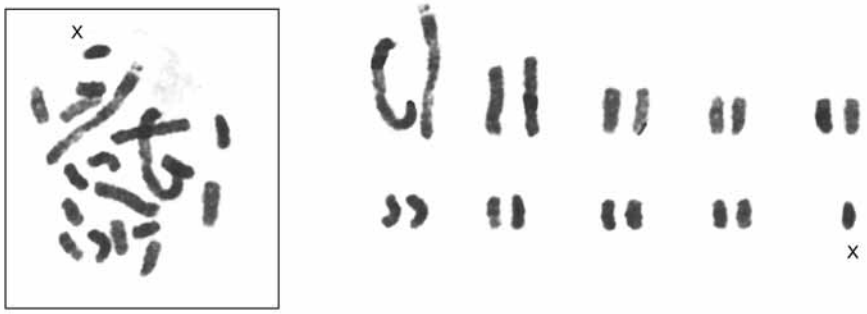


图 12-22 一种蝉（*Platypleura kaempferi*）的有丝分裂核型

染色体分带技术是经物理、化学因素处理后，再用染料对染色体进行分化染色，使其呈现特定的深浅不同带纹（band）的方法。分带技术可分为两大类，一类是产生的染色带分布在整过染色体的长度上如：G（图 12-23）、Q（图 12-24）和 R 带，另一类是局部性的显带，它只能使少数特定的区域显带，如 C（图 12-25）、Cd、T 和 N 带。

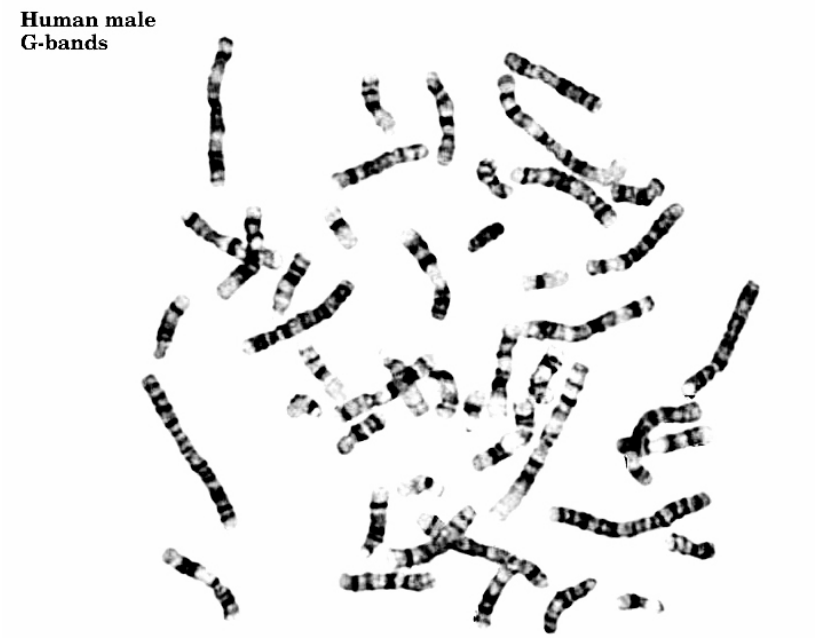


图 12-23 人类 G 带核型，G 带显示的是染色体上富含 AT 的区域

图 12-24 人类 Q 带核型，Q 带显示的带纹与 G 带相似

图 12-25 人类 C 带核型，C 带显示的是着丝粒异染色质

（五）几类的特殊的染色体

1．多线染色体

1881 年意大利的 Balbiani 发现于双翅目摇蚊幼虫的唾腺细胞。其特点是：①体积巨大（图 12-26），比其它体细胞染色体长 100-200 倍，体积大 1000-2000 倍，这是由于核内有丝分裂的结果，即染色体多次复制而不分离。②多线性，每条多线染色体由 500-4000 条解旋的染色体合并在一起形成。③体细胞联会，同源染色体紧密配对，并合并成一个染色体。④横带纹，染色后呈现出明暗相间的带纹。⑤膨突和环，在幼虫发育的某个阶段，多线染色体的某些带区疏松膨大，形成膨突（puff），或巴氏环（Balbiani ring）。用 H^3-TdR 处理细胞，发现膨突被标记，说明膨突是基因活跃转录的形态学标志。

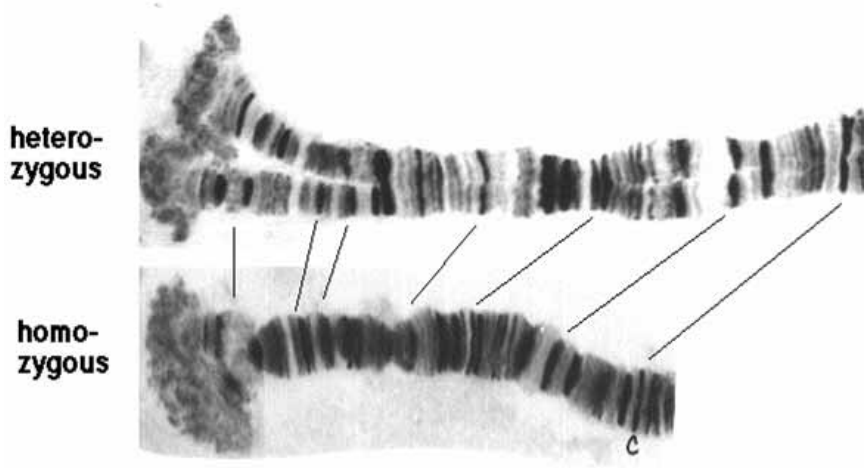


图 12-26 唾腺染色体

2．灯刷染色体

这种染色体最早发现于鱼类、两栖类和爬行类卵母细胞减数分裂的双线期。双线期是卵黄合成的旺盛期。由于染色体主轴两侧有侧环，状如灯刷，故名灯刷染色体（图 12-27）。由两条同源染色体组成，在交叉处结合，每条同源染色体含 2 条染色单体。轴上有一些染色粒，代表染色质紧密螺旋化的部位。同时两条染色单体向两边伸出许多侧环，侧环是 RNA 活跃转录的区域。

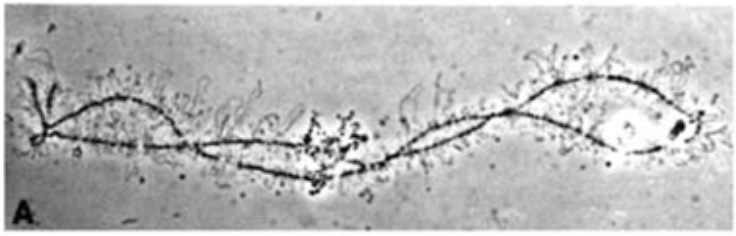


图 12-27 灯刷染色体

3．B 染色体

1928 年伦道夫（Randolph）把生物的正常染色体叫做 A 染色体，而把存在于许多动、植物中，形态和行为不同为 A 染色体的超数染色体称 B 染色体。

第三节 核仁

核仁（nucleolus）见于间期的细胞核内，呈圆球形，一般 1-2 个，也有多达 3-5 个的。核仁的位置不固定，或位于核中央，或靠近内核膜，核仁的数量和大小因细胞种类和功能而异。一般蛋白质合成旺盛和分裂增殖较快的细胞有较大和数目较多的核仁，反之核仁很小或缺如。核仁在分裂前期消失，分裂末期又重新出现。核仁的主要功能是转录 rRNA 和组装核糖体单位。

一、核仁形态

核仁与其他的细胞器不同，周围没有界膜包围，在电子显微镜下可辨认出有 3 个特征性的区域（图 12-28）。①纤维中心(fibrillar centers，FC)：是被致密纤维包围的一个或几个低电子密度的圆形结构，主要成分为 RNA 聚合酶和 rDNA，这些 rDNA 是裸露的分子。②致密纤维组分(dense fibrillar component，DFC)：呈环形或半月形包围 FC，由致密的纤维构成，是新合成的 RNP（指结合蛋白质的 rRNA），转录主要发生在 FC 与 DFC 的交界处。③颗粒组分(granular component，GC)：由直径 15-20 nm 的颗粒构成，是不同加工阶段的 RNP。

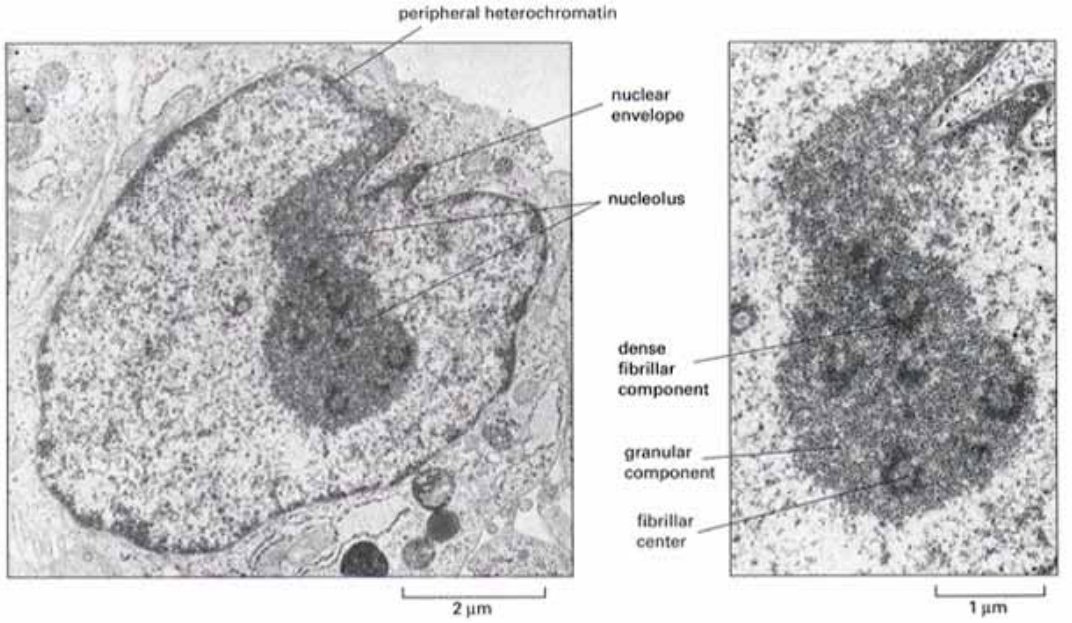


图 12-28 核仁结构

核仁相随染色质分为两部分，一部分位于核仁周围，称为核仁周染色质，属异染色质，一部分位于核仁内，为常染色质，即核仁组织区，是 rDNA 所在的位置。

二、核糖体

Robinson＆Brown（1953）发现于植物细胞。

Palacle（1955）发现于动物细胞。

Roberts（1958）建议命名为核糖核蛋白（ribosome），简称核糖体。

核糖体是细胞内合成蛋白质的工厂，在一个旺盛生长的细菌中，大约有 20000 个核糖体，其蛋白占细胞总蛋白的 10%，RNA 占细胞总 RNA 的 80%。

（一）、核糖体的结构

核糖体含 40%的蛋白质、60%的 RNA，蛋白按照一定的顺序与 RNA 结合，组成两个核糖体亚单体，其中 RNAs 是骨架结构，有些蛋白质不直接与 RNA 结合，而是结合在其它蛋白质组分上。核糖体中的蛋白质，rRNA 以及其他一些辅助因子在一起提供了翻译过程所需的全部酶活性，这些酶活性只有在核糖体整体结构存在的情况下才具备。

不同来源的核糖体其形状，大小、化学组成稍有不同，通常根据沉降系数的不同分为 70S 和 80S 两种类型，70S 核糖体存在于细菌，线粒体和叶绿体中，80S 核糖体存在于真核生物的细胞质中。

所有的核糖体都是由大小两个亚基构成，核糖体的大小亚单位只有在以 mRNA 为模板合成蛋白质时才结合在一起，肽链合成终止后，大小亚单位又解离，游离于细胞质基质中。核糖体并不是单独工作的，而是由多个甚至几十个串连在一条 mRNA 分子上，称多聚核糖体（polyribosome），这样越长的 mRNA 可以结合更多

的核糖体，提高了蛋白质合成的速度。

尽管原核生物与真核生物核糖体的蛋白质和 rRNA 差异很大，但结构总体相似，特别是负责与 mRNA 结合的小亚基。原核和真核细胞的 rRNA 都具有甲基化现象，这种甲基化与 RNA 的转录后加工过程的酶识别有关，另外原核 5SrRNA 和真核 5.8SrRNA 结构高度保守，常用于研究生物进化。

（二）、核糖体组装

编码 rRNA 的 DNA 片段称 rRNA 基因，它是重复的多拷贝基因，人的一个细胞中约有 200 个拷贝。rDNA 没有组蛋白核心，是裸露的 DNA 节段，两个相邻基因之间为一段非转录的间隔 DNA。

转录时，RNA 聚合酶沿 DNA 分子排列，此酶由基因头端向末端移动，转录好的 rRNA 分子从聚合酶处伸出，愈近末端愈长，并且从左右两侧均可伸出，呈羽毛状（图 12-29）。rRNA 首先出现在纤维部，而后转向颗粒部。

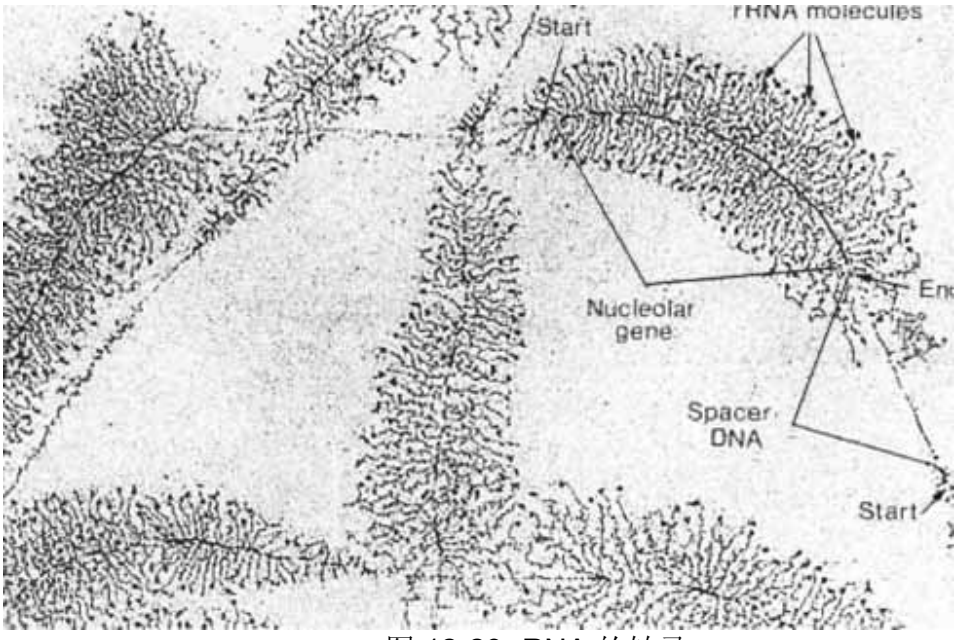


图 12-29 rRNA 的转录

纤维部的纤维状物质是新合成的 45SrRNA，它与蛋白质形成 RNP 复合体，45SrRNA 甲基化以后经 RNA 酶裂解为 2 个分子，18SrRNA 和 32SrRNA，后者再裂解为 28SrRNA 的 5.8srRNA。成熟的 rRNA 仅为 45SrRNA 的一半，丢失的大部分是非甲基化和 GC 含量较高的区域。

5SrRNA 的基因并不定位在核仁上，通常定位在常染色体，5SrRNA 合成后被转运至核仁区参与大亚基的装配（图 12-30）。

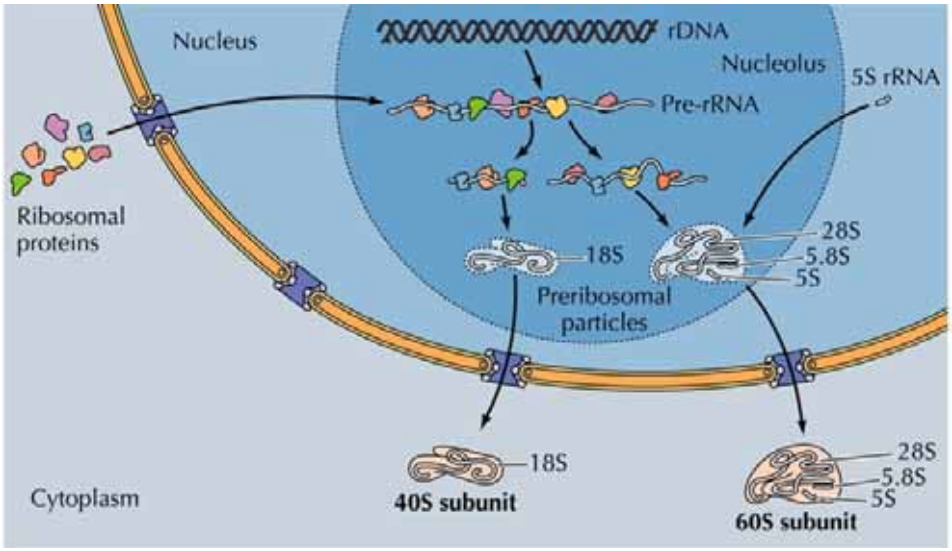


图 12-30 核糖体的组装

第四节 核基质

核基质（nuclear matrix ）或称核骨架（nucleoskeleton）为真核细胞核内的网络结构，是指除核被膜、染色质、核纤层及核仁以外的核内网架体系。由于核基质与 DNA 复制，RNA 转录和加工，染色体组装及病毒复制等生命活动密切相关，故日益受到重视。

（一）、核基质的组成

核基质的组成较为复杂，主要组分有三类：①非组蛋白性纤维蛋白，分子量 40-60KD，占 96%以上，其中相当一部分是含硫蛋白，其二硫键具有维持核骨架结构完整性的作用。除纤维蛋白外，还有 10 多种次要蛋白质，包括肌动蛋白和波形蛋白，后者构成核骨架的外罩。核骨架碎片中还存在三种支架蛋白（scaffold proteins，SCI、SCII、SCIII），SCII、III 的功能尚不明确，SCI 是 DNA 拓朴异构酶 II。②少量 RNA 和 DNA，RNA 对维持核骨架的三维结构是必需的，而 DNA 称为基质或支架附着区（matrix /scaffold associated region, MAR 或 SAR），通常为富含 AT 的区域。③少量磷脂（1.6%）和糖类（0.9%）。

核骨架纤维粗细不等，直径为 3-30nm，形成三维网络结构与核纤层，与核孔复合体相接，将染色质和核仁网络在其中。核骨架-核纤层-中间纤维三者相互联系形成一个贯穿于核、质间的统一网络系统。这一系统较微管、微丝具有更高的稳定性。

（二）核骨架的功能

1．为 DNA 的复制提供支架，DNA 是以复制环的形式锚定在核骨架上的，核骨架上有 DNA 复制所需要的酶，如：DNA 聚合酶 α、DNA 引物酶、DNA 拓朴异构酶 II 等。DNA 的自主复制序列（ARS）也是结合在核骨架上。
2．是基因转录加工的场所，RNA 的转录同样需要 DNA 锚定在核骨架上才能进行，核骨架上有 RNA 聚合酶的结合位点，使之固定于核骨架上，RNA 的合成是在核骨架上进行的。新合成的 RNA 也结合在核骨架上，并在这里进行加工和修饰。
3．与染色体构建有关，现在一般认为核骨架与染色体骨架为同一类物质，30nm 的染色质纤维就是结合在核骨架上，形成放射环状的结构，在分裂期进一步包装成光学显微镜下可见的染色体（图 12-31）。

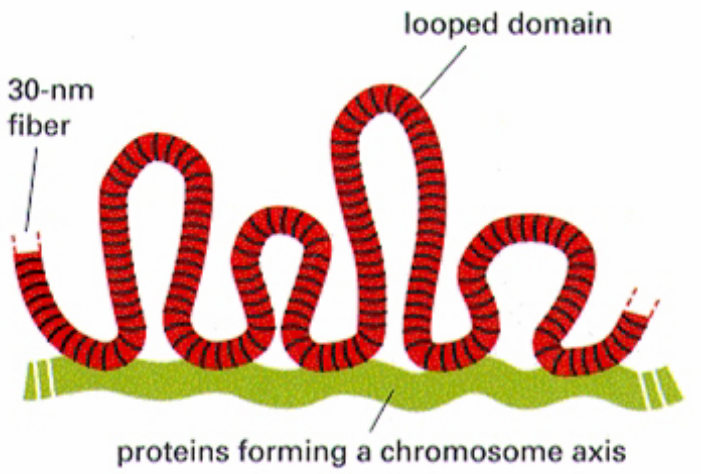


图 12-31 染色质结合在核骨架/染色体骨架上

第十三章 细胞周期

细胞增殖是生命的基本特征，种族的繁衍、个体的发育、机体的修复等都离不开细胞增殖。一个受精卵发育为初生婴儿，细胞数目增至10^{12}个，长至成年有10^{14}个，而成人体内每秒钟仍有数百万新细胞产生，以补偿血细胞、小肠粘膜细胞和上皮细胞的衰老和死亡。细胞增殖是通过细胞周期（cell cycle）来实现的，而细胞周期的有序运行是通过相关基因的严格监视和调控来保证的。细胞无限制增长对个体来说意味着癌症，个体无限制繁殖对地球来说意味着灾难。一个大肠杆菌若按20分钟分裂一次，并保持这一速度，则两天即可超过地球的重量。

第一节 基本概念

一、什么是细胞周期

细胞周期指由细胞分裂结束到下一次细胞分裂结束所经历的过程，所需的时间叫细胞周期时间。可分为四个阶段（图13-1）：①G_1期(gap1)，指从有丝分裂完成到期DNA复制之前的间隙时间；②S期(synthesis phase)，指DNA复制的时期，只有在这一时期H^3-TDR才能掺入新合成的DNA中；③G_2期(gap2)，指DNA复制完成到有丝分裂开始之前的一段时间；④M期又称D期(mitosis or division)，细胞分裂开始到结束。

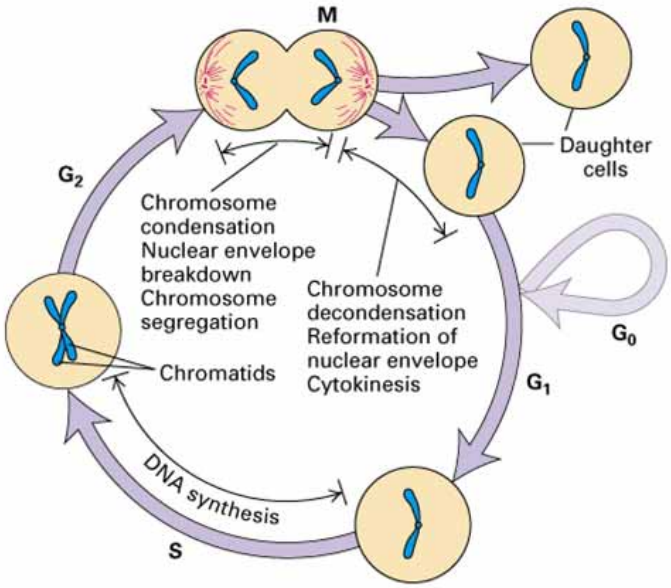


图13-1 细胞周期可划分为四个阶段

从增殖的角度来看，可将高等动物的细胞分为三类：①连续分裂细胞，在细胞周期中连续运转因而又称为周期细胞，如表皮生发层细胞、部分骨髓细胞。②休眠细胞暂不分裂，但在适当的刺激下可重新进入细胞周期，称G_0期细胞，如淋巴细胞、肝、肾细胞等。③不分裂细胞，指不可逆地脱离细胞周期，不再分裂的细胞，又称终端细胞，如神经、肌肉、多形核细胞等等。

细胞周期的时间长短与物种的细胞类型有关，如：小鼠十二指肠上皮细胞的周期为10小时，人类胃上皮细胞24小时，骨髓细胞18小时，培养的人了成纤维细胞18小时，CHO细胞14小时，HeLa细胞21小时。不同类型细胞的G_1长短不同，是造成细胞周期差异的主要原因。

二、细胞周期时间的测定

标记有丝分裂百分率法（percentage labeled mitoses，PLM）是一种常用的测定细胞周期时间的方法。其原理是对测定细胞进行脉冲标记、定时取材、利用放射自显影技术显示标记细胞，通过统计标记有丝分裂细胞百分数的办法来测定细胞周期。

有关名词：

T_{G1}：G_1期的持续时间

T_{G2}：G_2期的持续时间

T_S：S期的持续时间

T_M：M期的持续时间

T_C：一个细胞周期的持续时间

PLM：标记的有丝分裂细胞所占的比例

TDR：胸腺嘧啶核苷，是DNA的特异前体，能被S期细胞摄入，而掺进DNA中。通常使用的是^3H或者^{14}C标记的TDR。

测定原理（图13-2）：

①待测细胞经^3H-TDR标记后，所有S期细胞均被标记。

②S期细胞经G_2期才进入M期，所以一段时间内PLM=0。

③开始出现标记M期细胞时，表示处于S期最后阶段的细胞，已渡过G_2期，所以从PLM=0到出现PLM的时间间隔为T_{G2}。

④S期细胞逐渐进入M期，PLM上升，到达到最高点的时候说明来自处于S最后阶段的细胞，已完成M，进入G_1期。所以从开始出现M到PLM达到最高点（≈100%）的时间间隔就是T_M。

⑤当PLM开始下降时，表明处于S期最初阶段的细胞也已进入M期，所以出现LM到PLM又开始下降的一段时间等于T_S。

⑥从LM出现到下一次LM出现的时间间隔就等于T_C，根据$T_C=T_{G1}+T_S+T_{G2}+T_M$即可求出的$T_{G1}$长度。

事实上由于一个细胞群体中T_C和各时相不尽相同，第一个峰常达不到100%，以后的峰会发生衰减，PLM不一定会下降到零，所以实际测量时，常以（$T_{G2}+1/2T_M$）$-T_{G2}$的方式求出T_M。

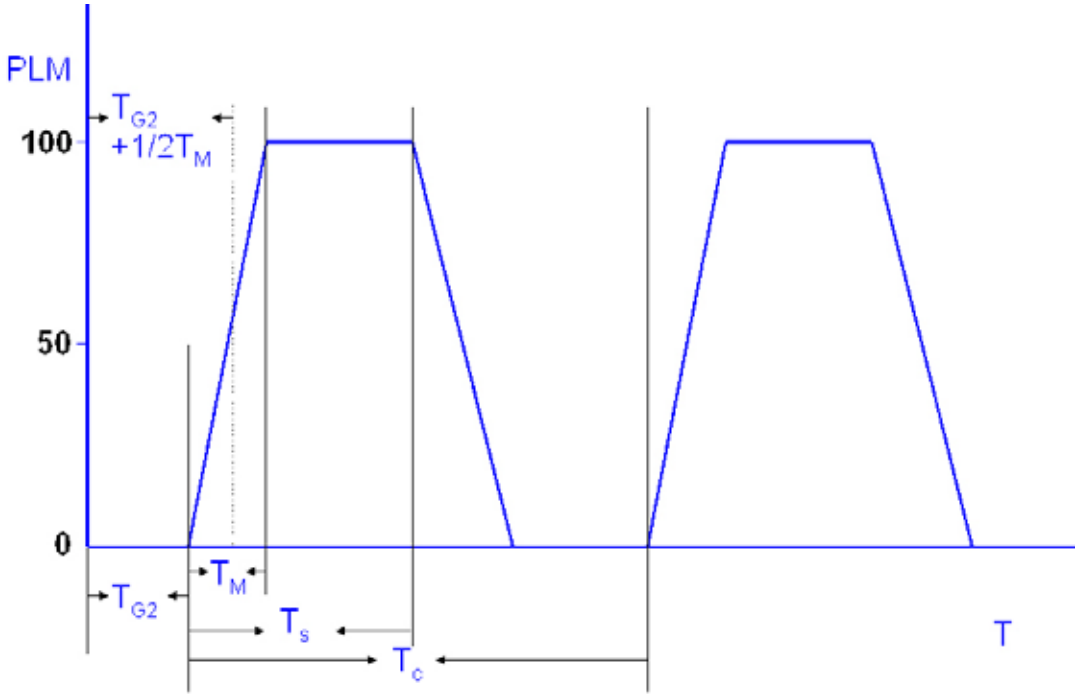


图13-2 细胞周期各阶段的时间与PLM的关系

三、细胞同步化

细胞同步化(synchronization)是指在自然过程中发生或经人为处理造成的细胞周期同步化，前者称自然同步化，后者称为人工同步化。

（一）自然同步化

1．多核体

如粘菌只进行核分裂，而不发生胞质分裂，形成多核体。数量众多的核处于同一细胞质中，进行同步化分裂，使细胞核达10^8，体积达5~6cm。疟原虫也具有类似的情况。

2．某些水生动物的受精卵

如海胆卵可以同时授精，最初的3次细胞分裂是同步的，再如大量海参卵受精后，前9次细胞分裂都是同步化进行的。

3．增殖抑制解除后的同步分裂

如真菌的休眠孢子移入适宜环境后，它们一起发芽，同步分裂。

（二）人工同步化

1．选择同步化

1）有丝分裂选择法：使单层培养的细胞处于对数增殖期，此时分裂活跃，MI高。有丝分裂细胞变圆隆起，与培养皿的附着性低，此时轻轻振荡，M 期细胞脱离器壁，悬浮于培养液中，收集培养液，再加入新鲜培养液，依法继续收集，则可获得一定数量的中期细胞。其优点是，操作简单，同步化程度高，细胞不受药物伤害，缺点是获得的细胞数量较少。（分裂细胞约占 1%～2%）

2）细胞沉降分离法：不同时期的细胞体积不同，而细胞在给定离心场中沉降的速度与其半径的平方成正比，因此可用离心的方法分离。其优点是可用于任何悬浮培养的细胞，缺点是同步化程度较低。

2．诱导同步化

1）DNA 合成阴断法：选用 DNA 合成的抑制剂，可逆地抑制 DNA 合成，而不影响其他时期细胞的运转，最终可将细胞群阻断在 S 期或 G/S 交界处。5-氟脱氧尿嘧啶、羟基脲、阿糖胞苷、氨甲蝶呤、高浓度 ADR、GDR 和 TDR，均可抑制 DNA 合成使细胞同步化。其中高浓度 TDR 对 S 期细胞的毒性较小，因此常用 TDR 双阻断法诱导细胞同步化：

在细胞处于对数生长期的培养基中加入过量TDR，（Hela，2mol/L；CHO，7.5mol/L）。S期细胞被抑制，其它细胞继续运转，最后停在G_1/S交界处。

移去TDR。洗涤细胞并加入新鲜培养液、细胞又开始分裂。当释放时间大于T_S时，所有细胞均脱离S期，再次加入过量TDR，细胞继续运转至G_1/S交界处，被过量TDR抑制而停止。

优点是同步化程度高，适用于任何培养体系。可将几乎所有的细胞同步化。缺点是产生非均衡生长，个别细胞体积增大。

2）中期阻断法：利用破坏微管的药物将细胞阻断在中期，常用的药物有秋水仙素和秋水仙酰胺，后者毒性较少。优点是无非均衡生长现象，缺点是可逆性较差。

第二节 有丝分裂

一、细胞分裂的类型

细胞分裂(cell division)可分为无丝分裂(amitosis)、有丝分裂(mitosis)和减数分裂(meiosis)三种类型。

无丝分裂又称为直接分裂，由R. Remark（1841）首次发现于鸡胚血细胞。表

现为细胞核伸长，从中部缢缩，然后细胞质分裂，其间不涉及纺锤体形成及染色体变化，故称为无丝分裂。无丝分裂不仅发现于原核生物，同时也发现于高等动植物，如植物的胚乳细胞、动物的胎膜，间充组织及肌肉细胞等等。

有丝分裂，又称为间接分裂，由W. Fleming (1882)年首次发现于动物及E. Strasburger（1880）年发现于植物。特点是有纺锤体染色体出现，子染色体被平均分配到子细胞，这种分裂方式普遍见于高等动植物。

减数分裂是指染色体复制一次而细胞连续分裂两次的分裂方式，是高等动植物配子形成的分裂方式。

二、有丝分裂

有丝分裂过程是一个连续的过程，为了便于描述人为的划分为六个时期：间期（interphase）、前期(prophase)、前中期(premetaphase)、中期(metaphase)、后期(anaphase)和末期(telophase)。其中间期包括G_1期、S期和G_2期，主要进行DNA复制等准备工作。

（一）前期

前期（图13-3）的主要事件是：①染色质凝缩，②分裂极确立与纺锤体开始形成，③核仁解体，④核膜消失。

前期最显著的特征是染色质通过螺旋化和折叠，变短变粗，形成光学显微镜下可以分辨的染色体，每条染色体包含2个染色单体。

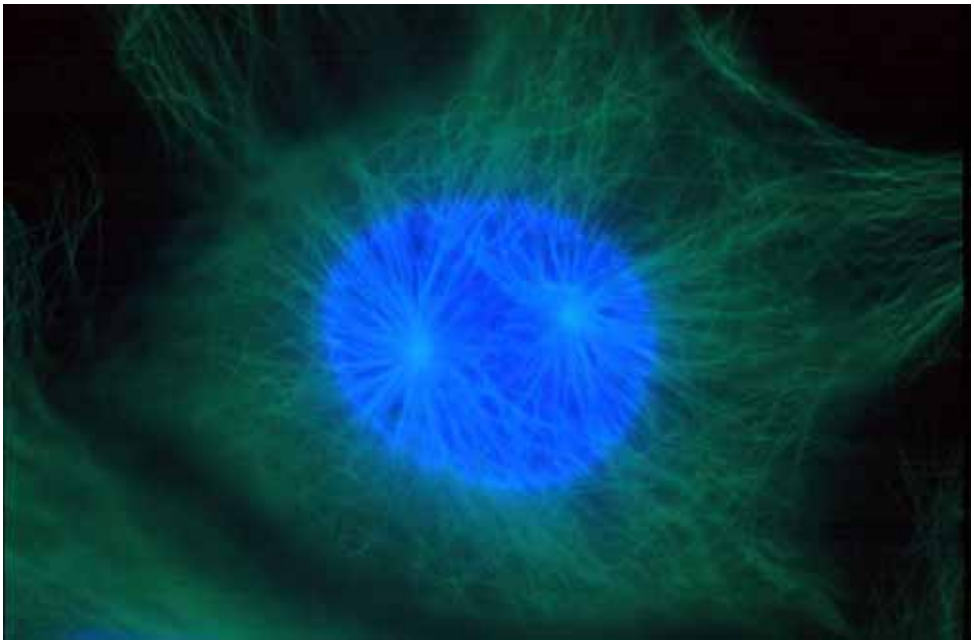


图13-3 前期两个中心体向两极移动（图片来自http://www.wadsworth.org/）

早在S期两个中心粒已完成复制，在前期移向两极，两对中心粒之间形成纺锤体微管，当核膜解体时，两对中心粒已到达两极，并在两者之间形成纺锤体，纺锤体微管包括：

①着丝点微管（kinetochore mt）：由中心体发出，连接在着丝点上，负责将染色体牵引到纺锤体上，着丝点上具有马达蛋白。

②星体微管（astral mt）：由中心体向外放射出，末端结合有分子马达，负责两极的分离，同时确定纺锤体纵轴的方向。

③极体微管（polar mt或overlap mt）：由中心体发出，在纺锤体中部重叠，重叠部位结合有分子马达，负责将两极推开。

有两类马达蛋白参与染色体、分裂极的分离，一类是dynein，另一类是kinesin。

植物没有中心粒和星体，其纺锤体叫作无星纺锤体，分裂极的确定机理尚不明确。

（二）前中期

指由核膜解体到染色体排列到赤道面(equatorial plane)这一阶段（图13-4）。纺锤体微管向细胞内部侵入，与染色体的着丝点结合。着丝点处的分子马达使染色体向微管的负端移动。在光镜下可以看到，此时染色体也就是既向一极移动也向另一极移动，是以振荡的方式移向纺锤体中部的。其原因是姊妹染色单体的着丝点都结合有微管和分子马达。

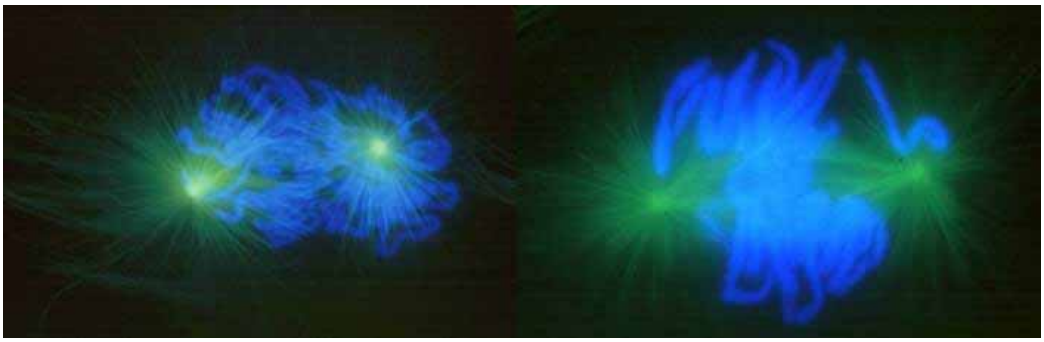


图13-4 左，前中期； 右，中期（图片来自http://www.wadsworth.org/）

（三）中期

指从染色体排列到赤道面上（图13-4右、13-5），到姊妹染色单体开始分向两极的一段时间，纵向观动物染色体呈辐射状排列。染色体两边的牵引力就像拔河一样达到平衡。

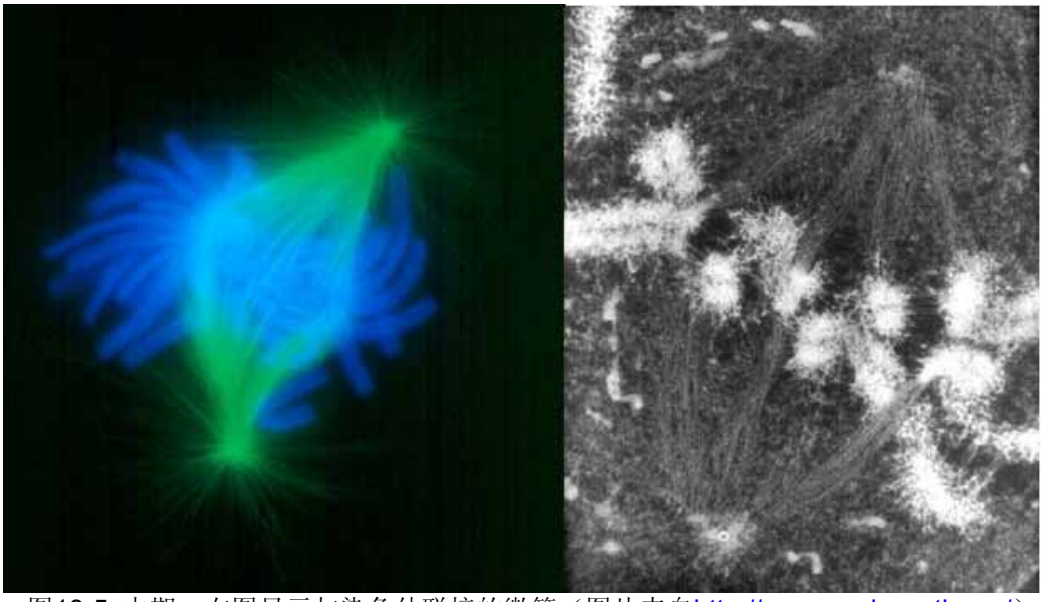


图13-5 中期，右图显示与染色体联接的微管（图片来自http://www.wadsworth.org/）

（四）后期

指姊妹染色单体分开并移向两极的时期，当子染色体到达两极后，标志这一时期结束（图13-6）。

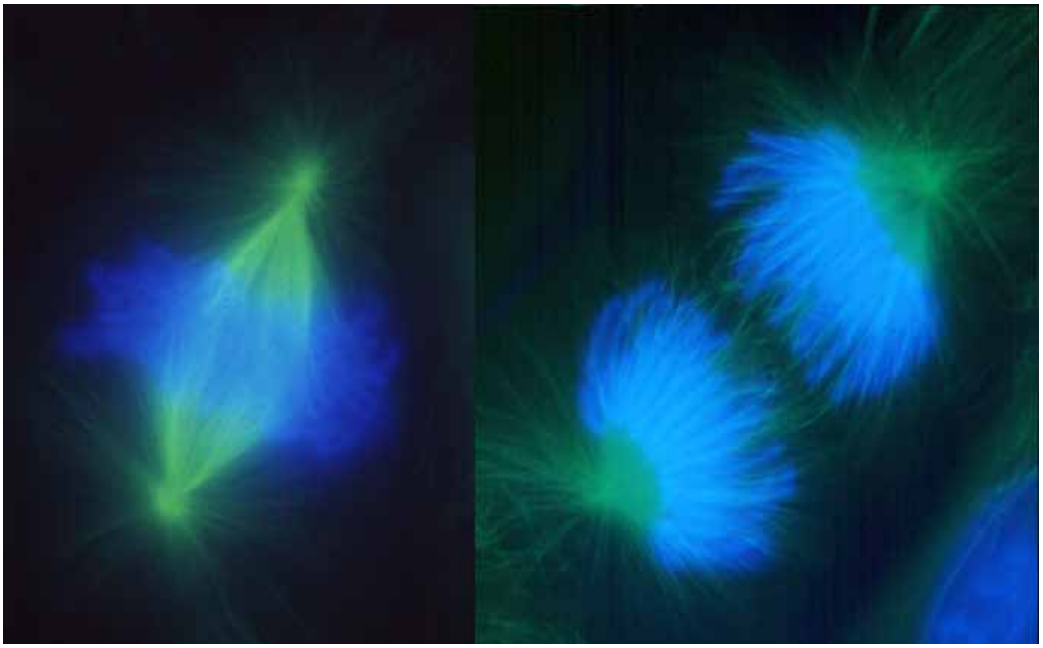


图13-6 后期姊妹染色单体分离（图片来自http://www.wadsworth.org/）

后期可以分为两个方面（图13-7）：①后期A，指染色体向两极移动的过程。这是因为染色体着丝点微管在着丝点处去组装而缩短，在分子马达的作用下染色体向两极移动，体外实验证明即使在不存在ATP的情况下，染色体着丝点也有连接到正

在去组装的微管上的能力，使染色体发生移动。②后期B，指两极间距离拉大的过程。这是因为一方面极体微管延长，结合在极体微管重叠部分的马达蛋白提供动力，推动两极分离，另一方面星体微管去组装而缩短，结合在星体微管正极的马达蛋白牵引两极距离加大。可见染色体的分离是在微管与分子马达的共同作用下实现的（图13-8）。

后期A，B是用药物鉴定出来的，如紫杉酚（taxol）能结合在微管的(+)端，抑制微管(+)端去组装，从而抑制后期A。动物中通常先发生后期A，再后期B，但也有些只发生后期A，还有的后期A、B同时发生。植物细胞没有后期B。

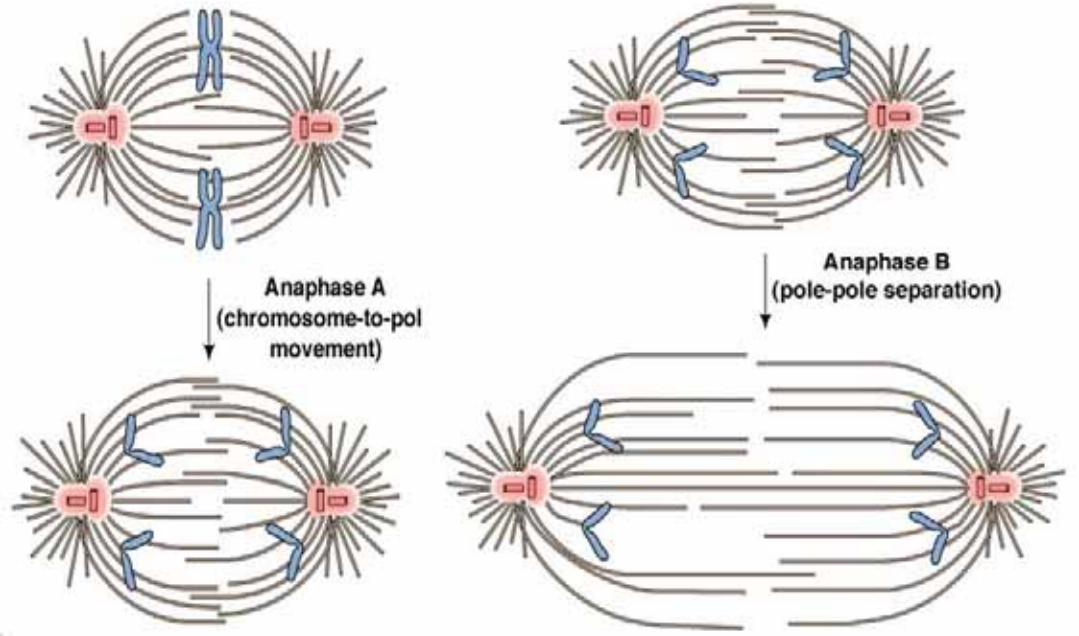


图13-7 后其A染色体分离，后期B两极延伸

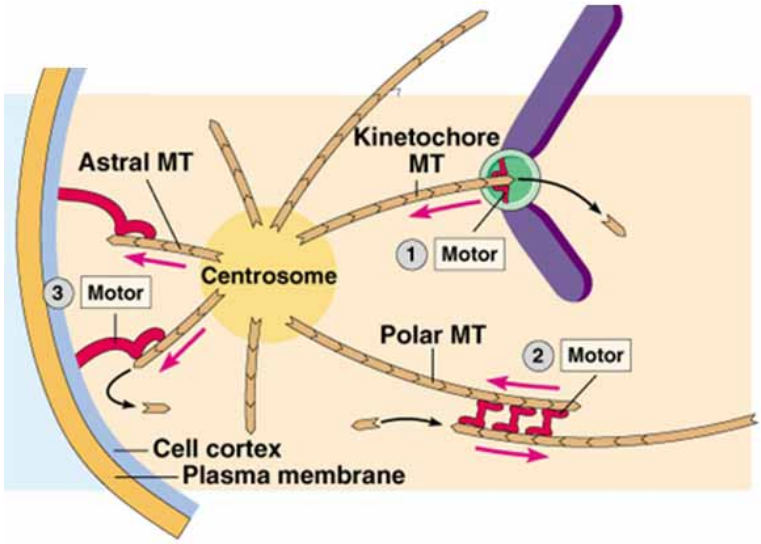


图13-8 马达蛋白和微管系统共同协作，使染色体分离

（五）末期

末期（图13-9）是从子染色体到达两极，至形成两个新细胞为止的时期。末期涉及子核的形成和胞质分裂两个方面。

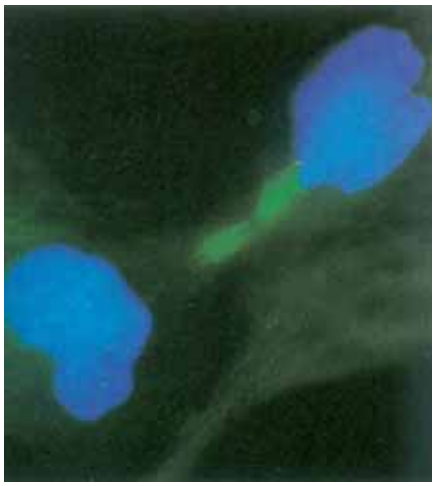


图13-9 末期

1、子核的形成

末期子核的形成，大体经历了与前期相反的过程，即染色体解聚缩，核仁出现和核膜重新形成。核仁由染色体上的核仁组织中心形成（NORs），几个NOR_S共同组成一个大的核仁，因此核仁的数目通常比NORs的数目要少。

前期核膜解体后，核纤层蛋白B与核膜残余小泡结合，末期核纤层蛋白B去磷酸化，介导核膜的重新装配。

2、胞质分裂

虽然核分裂与胞质分裂（cytokinesis）是相继发生的，但属于两个分离的过程，例如大多数昆虫的卵，核可进行多次分裂而无胞质分裂，某些藻类的多核细胞可长达数尺，以后胞质才分裂形成单核细胞。

动物细胞的胞质分裂是以形成收缩环的方式完成的（图13-10），收缩环在后期形成，由大量平行排列的肌动蛋白和结合在上面的myosin II等成分组成，用细胞松驰素及肌动蛋白和肌球蛋白抗体处理均能抑制收缩环的形成。不难想象胞质收缩环工作原理和肌肉收缩时一样的。

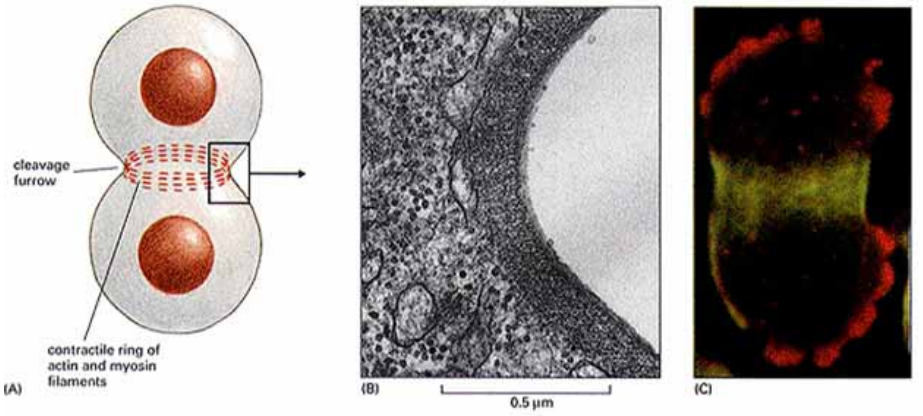


图13-10 动细胞的胞质收缩环

动物胞质分裂的另一特点是形成中体。末期纺锤体开始瓦解消失，但在纺锤体的中部微管数量增加，其中掺杂有高电子密度物质和囊状物，这一结构称为中体。在胞质分裂中的作用尚不清楚。

植物胞质分裂的机制不同于动物，后期或末期两极处微管消失，中间微管保留，并数量增加，形成桶状的成膜体(phragmoplast)。来自于高尔基体的囊泡沿微管转运到成膜体中间，融合形成细胞板。囊泡内的物质沉积为初生壁和中胶层，囊泡膜形成新的质膜，由于两侧质膜来源于共同的囊泡，因而膜间有许多连通的管道，形成胞间连丝。源源不断运送来的囊泡向细胞板融合，使细胞板扩展，形成完整的细胞壁，将子细胞一分为二（图13-11）。

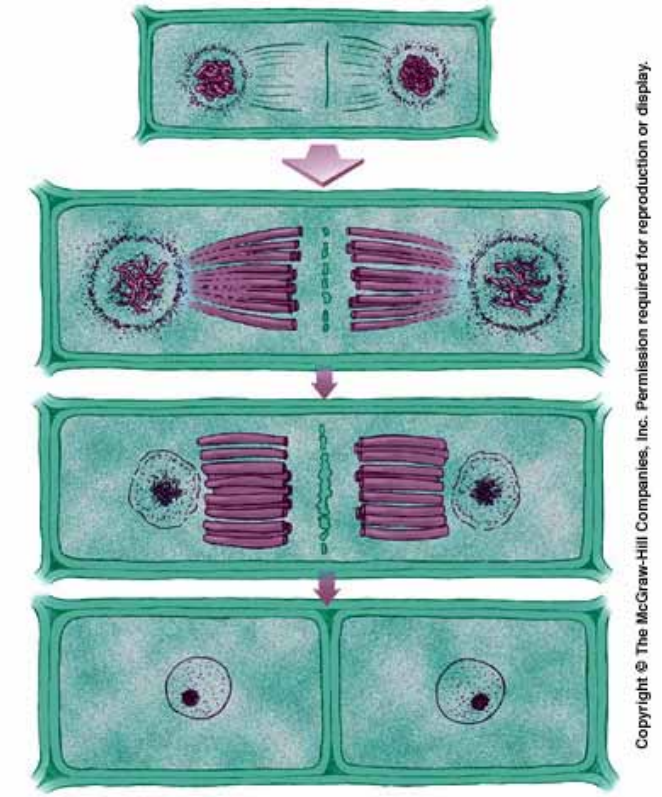


图13-11 植物细胞成膜体的形成

第三节 减数分裂

减数分裂（Meiosis）的特点是DNA复制一次，而细胞连续分裂两次，形成单倍体的精子和卵子（图13-12），通过受精作用又恢复二倍体，减数分裂过程中同源染色体间发生交换，使配子的遗传多样化，增加了后代的适应性，因此减数分裂不仅是保证生物种染色体数目稳定的机制，同且也是物种适应环境变化不断进化的机制。

减数分裂由紧密连接的两次分裂构成。通常减数分裂I分离的是同源染色体，所以称为异型分裂（heterotypic division）或减数分裂（reductional division）。减数分裂II分离的是姊妹染色体，类似于有丝分裂，所以称为同型分裂（homotypic division）或均等分裂（equational division）。和有丝分裂一样为了描述方便将减数分裂分为几个期和亚期（图13-13）。

Spermatogenesis in *Gargara genistae*

1. Zygotene; **2.** early pachytene bouquet; **3.** pachytene; **4.** diplotene; **5.** diakinesis; **6.** prometaphase; **7.** metaphase; **8.** early anaphase; **9.** anaphase, showing the prereduction of X chromosome; **10.** telophase, X chromosome lagging behind; **11.** metaphase Ⅱ with 9 chromosomes; **12.** mitotic prometaphase with 19 chromosomes.

图13-12 黑圆角蝉的精子发生

减数分裂可分为3种主要类型：

配子减数分裂（gametic meiosis），也叫末端减数分裂(terminal meiosis)，其特点是减数分裂和配子的发生紧密联系在一起，在雄性脊椎动物中，一个精母细胞经过减数分裂形成4个精细胞，后者在经过一系列的变态发育，形成成熟的精子。在雌性脊椎动物中，一个卵母细胞经过减数分裂形成1个卵细胞，和2-3个极体。

孢子减数分裂（sporic meiosis），也叫中间减数分裂(intermediate meiosis)，见于植物和某些藻类。其特点是减数分裂和配子发生没有直接的关系，减数分裂的结果是形成单倍体的配子体（小孢子和大孢子）。小孢子再经过两次有次分裂形成包含一个营养核和两个雄配子（精子）的成熟花粉（雄配子体），大孢子经过三次有丝分裂形成胚囊（雌配子体），内含一个卵核、两个极核、3个反足细胞和两个助细胞。

合子减数分裂（zygotic meiosis），也叫初始减数分裂(initial meiosis),仅见于真菌和某些原核生物，减数分裂发生于合子形成之后，形成单倍体的孢子，孢子通过有丝分裂产生单倍体的后代。也就是说这类生物正常的生长个体是单倍体的。

此外某些生物还具有体细胞减数分裂（somatic meiosis）现象，如在蚊子幼虫的肠道中，有一些由核内有丝分裂形成的多倍体细胞（可高达32X），在蛹期又通过减数分裂降低了染色体倍性，增加了细胞数目。

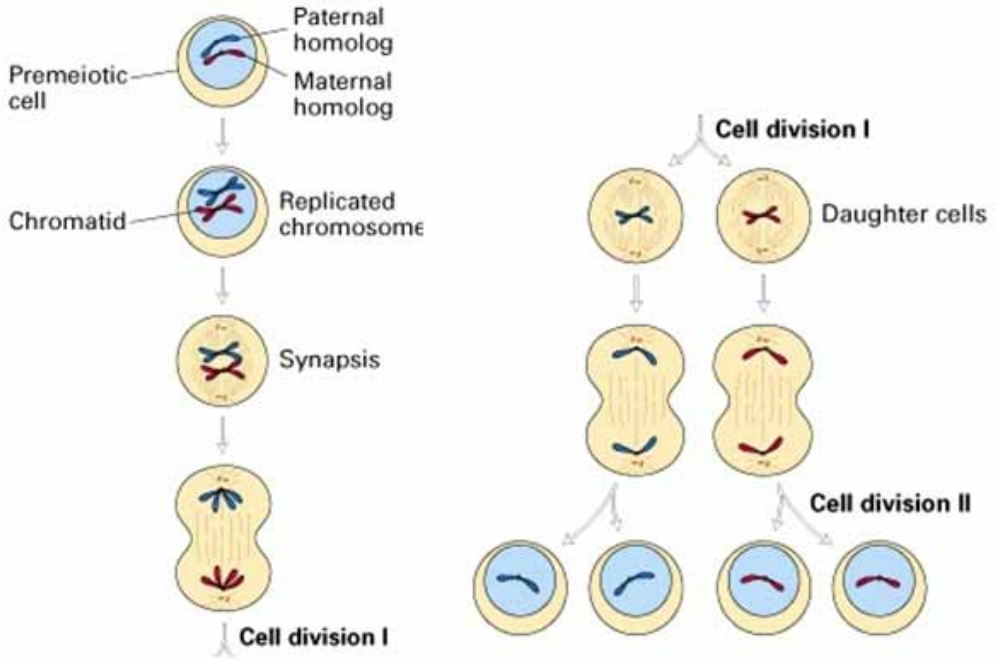


图13-13 减数分裂模式图

一、间期

有丝分裂细胞在进入减数分裂之前要经过一个较长的间期，称前减数分裂间期(premeiotic interphase)或前减数分裂期(premeiosis)。

前减数分裂期也可分为G_1期、S期和G_2期，在G_1期和S期把麝香百合的花粉每

细胞在体外培养，则发现细胞进行有丝分裂，将G_2晚期的细胞在体外培养则向减数分裂进行，说明G_2期是有丝分裂向减数分裂转化的关键时期。

和有丝分裂不同的是，DNA不仅在S期合成，而且也在前期合成一小部分。D. E. Wimber和 W. Prensky（1963）认为合线期-粗线期合成大约2%的DNA。Y. Hotta等人（1966）在百合属（*Lilium*）和延龄草属（*Trillium*）中发现，粗线期合成大约0.3%的DNA。称为合线期DNA（zyg-DNA）或粗线期DNA(P-DNA)。这些DNA的合成可能与联会复合体的形成有关。

二、分裂期

（一）、减数分裂 I

1、前期 I

减数分裂的特殊过程主要发生在前期I，前期通常人为划分为5个时期：①细线期（leptotene）、②合线期（zygotene）、③粗线期（pachytene）、④双线期（diplotene）、⑤终变期（diakinesis）。必须注意的是这5个阶段本身是连续的，它们之间没有截然的界限。

1）细线期: 染色体呈细线状，具有念珠状的染色粒。持续时间最长，占减数分裂周期的 40%。细线期虽然染色体已经复制，但光镜下分辨不出两条染色单体。由于染色体细线交织在一起，偏向核的一方，所以又称为凝线期(synizesis)，在有些物种中表现为染色体细线一端在核膜的一侧集中，另一端放射状伸出，形似花束，称为花束期(bouquet stage)。

2）合线期：持续时间较长，占有丝分裂周期的 20%。亦称偶线期，是同源染色体配对的时期，这种配对称为联会(synapsis)。这一时期同源染色体间形成联会复合体(synaptonemal complex，SC)。在光镜下可以看到两条结合在一起的染色体，称为二价体（bivalent），每一对同源染色体都经过复制，含四个染色单体，所以又称为四分体（tetrad）。

3)粗线期：持续时间长达数天，此时染色体变短，结合紧密，在光镜下只在局部可以区分同源染色体，这一时期同源染色体的非姊妹染色单体之间发生交换的时期。在果蝇粗线期 SC 上具有与 SC 宽度相近的电子致密球状小体，称为重组节，与 DNA 的重组有关。

4）双线期：联会的同源染色体相互排斥、开始分离，但在交叉点(chiasma)上还保持着联系。双线期染色体进一步缩短，在电镜下已看不到联会复合体。

交叉的数目和位置在每个二价体上并非是固定的，而随着时间推移，向端部移动，这种移动现象称为端化(terminalization)，端化过程一直进行到中期。

植物细胞双线期一般较短，但在许多动物中双线期停留的时间非常长，人的卵母细胞在五个月胎儿中已达双线期，而一直到排卵都停在双线期，排卵年龄大约在 12-50 岁之间。成熟的卵细胞直到受精后，才迅速完成两次分裂，形成单倍体的卵

核。

在鱼类、两栖类、爬行类、鸟类以及无脊椎动物的昆虫中，双线期的二价体解螺旋而形成灯刷染色体，这一时期是卵黄积累的时期。

5）终变期：二价体显著变短，并向核周边移动，在核内均匀散开，所以是观察染色体的良好时期。核仁此时开始消失，核被膜解体，但有的植物，如玉米，在终变期核仁仍然很显著。

终变期由于交叉端化过程的进一步发展，故交叉数目减少，通常只有一至二个交叉，二价体的形状表现出多样性，如 V 形或 O 形。

2、中期 I

核仁消失，核被膜解体，标志进入中期I，中期I的主要特点是染色体排列在赤道面上。每个二价体有4个着丝粒、姊妹染色单位的着丝粒定向于纺锤体的同一极，故称联合定向(co-orientation)。

3、后期 I

二价体中的两条同源染色体分开，分别向两极移动。由于相互分离的是同源染色体，所以染色体数目减半。但每个子细胞的DNA含量仍为2C。同源染色体随机分向两极，使母本和父本染色体重所组合，产生基因组的变异。如人类染色体是23对，染色体组合的方式有2^{23}个（不包括交换），因此除同卵孪生外，几乎不可能得到遗传上等同的后代。

4、末期 I

染色体到达两极后，解旋为细丝状、核膜重建、核仁形成，同时进行胞质分裂。

5、减数分裂间期

在减数分裂I和II之间的间期很短，不进行DNA的合成，有些生物没有间期，而由末期I直接转为前期II。

（二）、减数分裂 II

可分为前、中、后、末四个四期，与有丝分裂相似。

在动物中，通过减数分裂一个精母细胞形成4个精子，而一个卵母细胞形成一个卵子及2-3个极体。

三、联会复合体

联会复合体（synaptonemal complex, SC)是减数分裂合线期两条同源染色体之间形成的一种结构，它与染色体的配对，交换和分离密切相关。

SC是同源染色体间形成的梯子样的结构。在电镜下观察，两侧是约40nm的侧生组分(lateral element)，电子密度很高，两侧之间为宽约100nm的中间区(intermediate space)，在电镜下是明亮区，在中间区的中央为中央组分(central element)，宽约30nm。侧生组分与中央组分之间有横向排列的粗约7~10nm的SC纤维，使SC外观呈梯子状（图13-14）。

长期以来人们认为SC将同源染色体组织在一起，使伸入SC的DNA之间产生重组，但实验证明不仅SC的形成晚于基因重组的启动，而且基因突变不能形成SC的酵母中，同源染色体间照样可以发生交换。现在一般认为它与同源染色体间交换的完成有关。

在磷钨酸染色的SC中央，还可以看到呈圆形或椭圆形的重组节(recombination nodules,RNs)，RNs是同源染色体发生交叉的部位，RNs上有基因交换所需要的酶。

从形态学来看，SC形成合线期，成熟于粗线期，并存在数天，消失于双线期。联会复合体的形成与合线期DNA(Zyg-DNA)有关，在细线期或合线期加入DNA合成抑制剂，则抑制SC的形成。

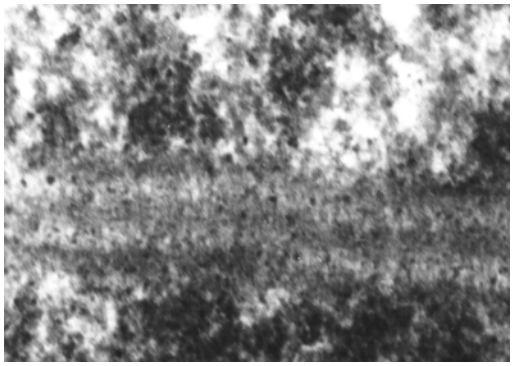


图13-14 一种昆虫的联会复合体

第四节 细胞周期的调控

一、研究背景

Rao和Johnson(1970、1972、1974)将Hela细胞同步于不同阶段，然后与M期细胞混合，在灭活仙台病毒介导下，诱导细胞融合，发现与M期细胞融合的间期细胞产生了形态各异的早熟凝集染色体(prematurely condensed chromosome，PCC)，这种现象叫做早熟染色体凝集(premature chromosome condensation)。

G_1期PCC为单线状，因DNA未复制。

S期PCC为粉末状，因DNA由多个部位开始复制。
G_2期PCC为双线染色体，说明DNA复制已完成。

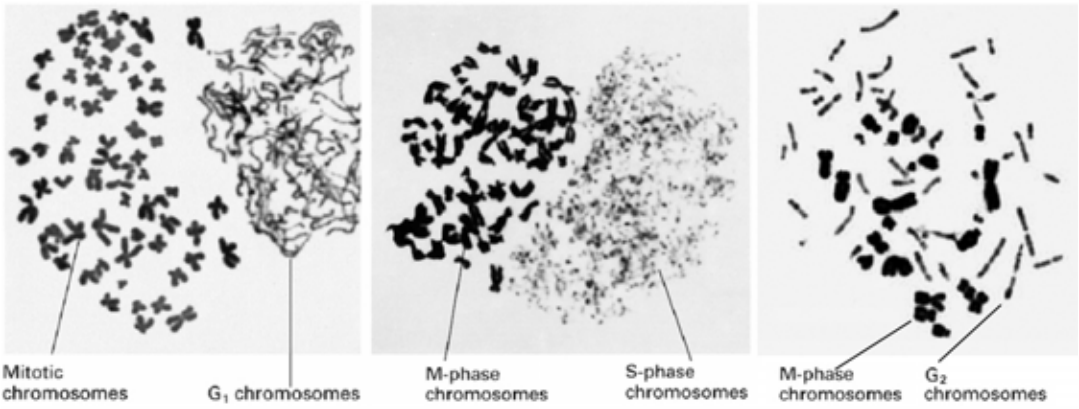


图13-15 不同形态的PCC

不仅同类M期细胞可以诱导PCC，不同类的M期细胞也可以诱导PCC产生，如人和蟾蜍的细胞融合时同样有这种效果，这就意味着M期细胞具有某种促进间期细胞进行分裂的因子，即成熟促进因子(maturation promoting factor，MPF)。

早在1960s，Yoshio Masui发现成熟蛙卵的提取物能促进未成熟卵的胚胞破裂(Germinal Vesicle Breakdown，GVBD)，后来Sunkara将不同时期Hela细胞的提取液注射到蛙卵母细胞中，发现G_1和S期的抽取物不能诱导GVBD，而G_2和M期的则具有促进胚胞破裂的功能，它将这种诱导物质称为有丝分裂因子(MF)。后来在CHO细胞，酵母和粘菌中也提取出相同性质的MF，这类物质被统称为MPF。

1960s Leland Hartwell以芽殖酵母（图13-16）为实验材料，利用阻断在不同细胞周期阶段的温度敏感突变株（在适宜的温度下和野生型一样），分离出了几十个与细胞分裂有关的基因(cell division cycle gene，CDC)。如芽殖酵母的cdc28基因，在G2/M转换点发挥重要的功能。Hartwell还通过研究酵母菌细胞对放射线的感受性，提出了checkpoint（细胞周期检验点）的概念，意指当DNA受到损伤时，细胞周期会停下来。

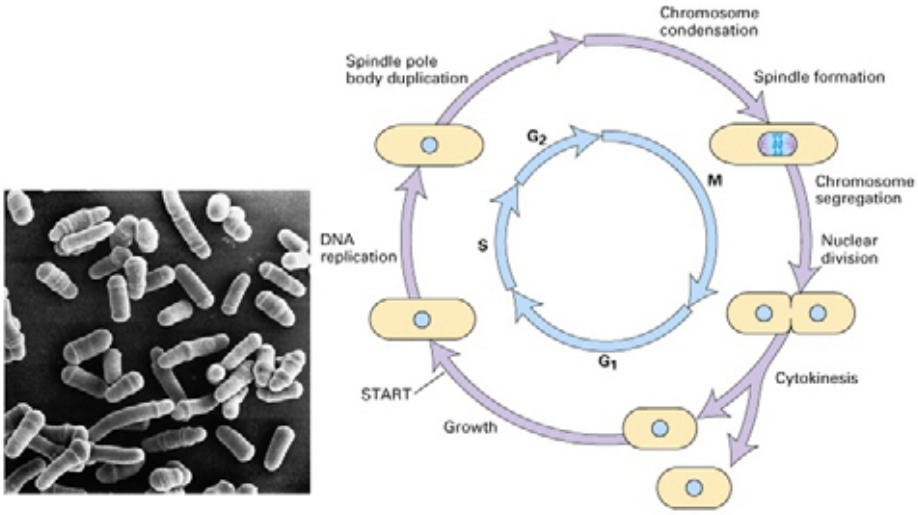


图13-16 裂殖酵母细胞周期

1970s Paul Nurse等人以裂殖酵母（图13-17）为实验材料，同样发现了许多细胞周期调控基因，如：裂殖酵母cdc2、cdc25的突变型和在限制的温度下无法分裂；wee1突变型则提早分裂，而cdc25和wee1都发生突变的个体却会正常地分裂（图13-18）。进一步的研究发现cdc2和cdc28都编码一个34KD的蛋白激酶，促进细胞周期的进行。而weel和cdc25分别表现为抑制和促进CDC2的活性。这也解释了为何cdc25和wee1双重突变的个体可以恢复野生型的表型。

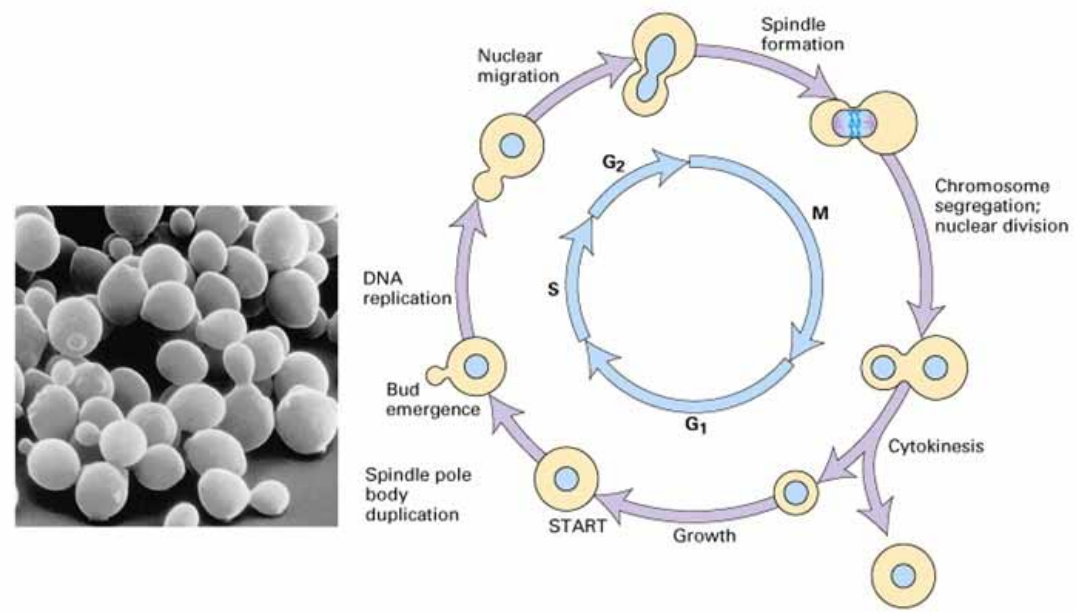


图13-17 芽殖酵母细胞周期

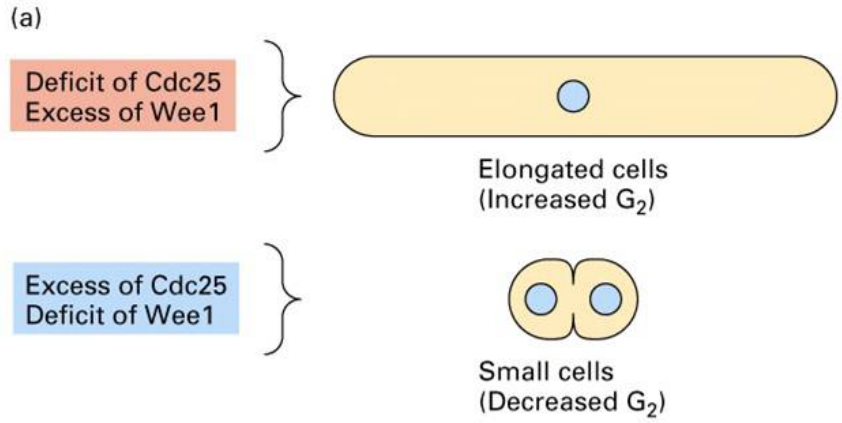


图13-18 Cdc25表达不足，细胞长得过长而不分裂；Wee1表达不足，细胞很小就开始分裂了

1983年Timothy Hunt首次发现海胆卵受精后，在其卵裂过程中两种蛋白质的含量随细胞周期剧烈振荡，在每一轮间期开始合成，G_2/M时达到高峰，M结束后突然消失，下轮间期又重新合成，故命名为周期蛋白(cyclin)。后来在青蛙、爪蟾、海胆、果蝇和酵母中均发现类似的情况，各类动物来源的细胞周期蛋白mRNA均能诱导蛙卵的成熟。用海洋无脊椎动物和两栖类的卵为实验材料进行这类实验，好处在于卵的量比较大，而且胚胎发育的早期细胞分裂是同步化的。

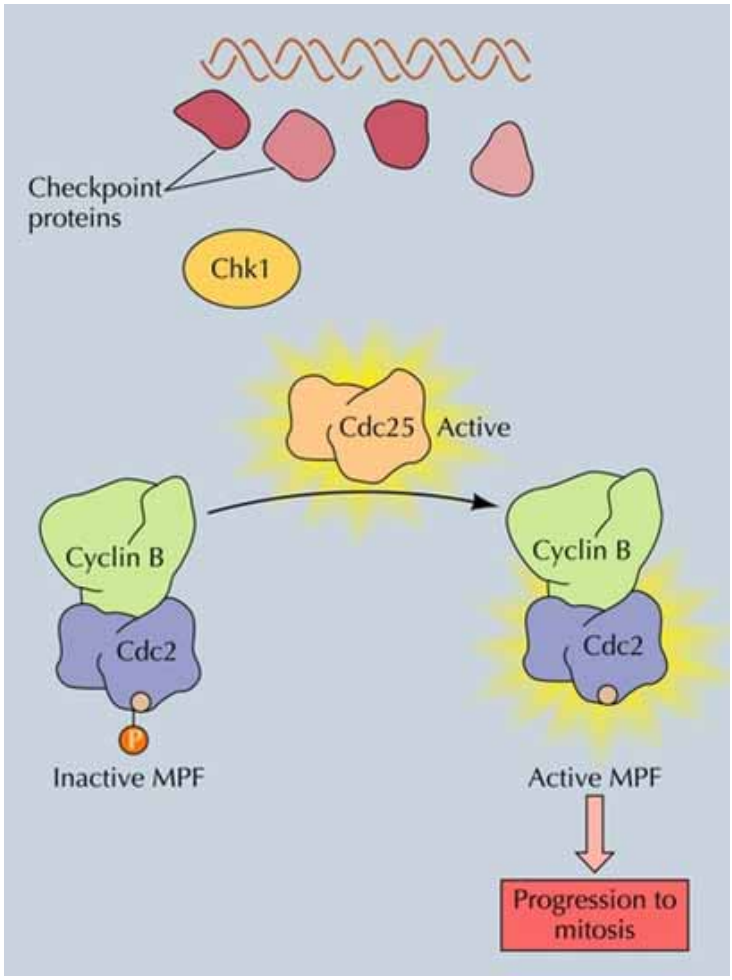


图13-19 MPF=CDC2+Cyclin B

1988年M. J. Lohka 纯化了爪蟾的MPF，经鉴定由32KD和45KD两种蛋白组成，二者结合可使多种蛋白质磷酸化（图13-19）。后来Paul Nurse（1990）进一步的实验证明P^{32}实际上是CDC2的同源物，而P^{45}是cyclinB的同源物，从而将细胞周期三个领域的研究联系在一起。2001年10月8日美国人Leland Hartwell、英国人Paul Nurse、Timothy Hunt因对细胞周期调控机理的研究而荣获诺贝尔生理医学奖（图13-20）。

图13-20 2001年诺贝尔生理医学奖获得者

二、CDK

CDC2与细胞周期蛋白结合才具有激酶的活性，称为细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase，CDK)，因此CDC2又被称为CDK1，激活的CDK1可将靶蛋白磷酸化而产生相应的生理效应，如将核纤层蛋白磷酸化导致核纤层解体、核膜消失，将H_1磷酸化导致染色体的凝缩等等。这些效应的最终结果是细胞周期的不断运行。因此，CDK激酶和其调节因子又被称作细胞周期引擎。

目前发现的CDK在动物中有7种。各种CDK分子均含有一段相似的激酶结构域，这一区域有一段保守序列，即PSTAIRE，与周期蛋白的结合有关。

三、CKI

细胞中还具有细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子（CDK inhibitor，CKI）对细胞周期起负调控作用，目前发现的CKI分为两大家族：

①Ink4(Inhibitor of cdk 4)，如$P16^{ink4a}$、$P15^{ink4b}$、$P18^{ink4c}$、$P19^{ink4d}$，特异性抑制cdk4·cyclin D1、cdk6·cyclin D1复合物。

②Kip(Kinase inhibition protein)：包括$P21^{cip1}$ (cyclin inhibition protein 1)、$P27^{kip1}$(kinase inhibition protein 1)、$P57^{kip2}$等，能抑制大多数CDK的激酶活性，$P21^{cip1}$还能与DNA聚合酶δ的辅助因子PCNA（proliferating cell nuclear antigen）结合，直接抑制DNA的合成（图13-21）。

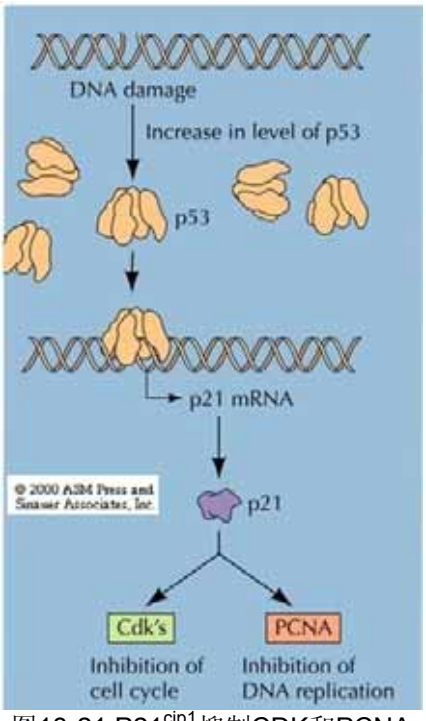


图13-21 $P21^{cip1}$抑制CDK和PCNA

四、Cyclin

周期蛋白不仅仅起激活CDK的作用，还决定了CDK何时、何处、将何种底物磷酸化，从而推动细胞周期的前进。目前从芽殖酵母、裂殖酵母和各类动物中分离出的周期蛋白有30余种，在脊椎动物中为A_{1-2}、B_{1-3} 、C、 D_{1-3}、E_{1-2}、F、G、H等。分为G_1型、G_1/S型S型和M型4类（见表13-1）。各类周期蛋白均含有一段约100个氨基酸的保守序列，称为周期蛋白框，介导周期蛋白与CDK结合。

表13-1不同类型的周期蛋白

激酶复合体	脊椎动物		芽殖酵母	
	Cyclin	CDK	Cyclin	CDK
G_1-CDK	Cyclin D*	CDK4 、6	Cln 3	CDK1(CDC28)
G_1/S-CDK	Cyclin E	CDK2	Cln 1、2	CDK1(CDC28)
S-CDK	Cyclin A	CDK2	Clb 5、6	CDK1(CDC28)
M-CDK	Cyclin B	CDK1(CDC2)	Clb 1-4	CDK1(CDC28)

*包括D_{1-3}，各亚型cyclin D，在不同细胞中的表达量不同，但具有相同的功效

细胞在生长因子的刺激下，G_1期cyclin D表达，并与CDK4、CDK6结合，使下游的蛋白质如Rb磷酸化，磷酸化的Rb释放出转录因子E2F，促进许多基因的转录，如编码cyclinE、A和CDK1的基因。

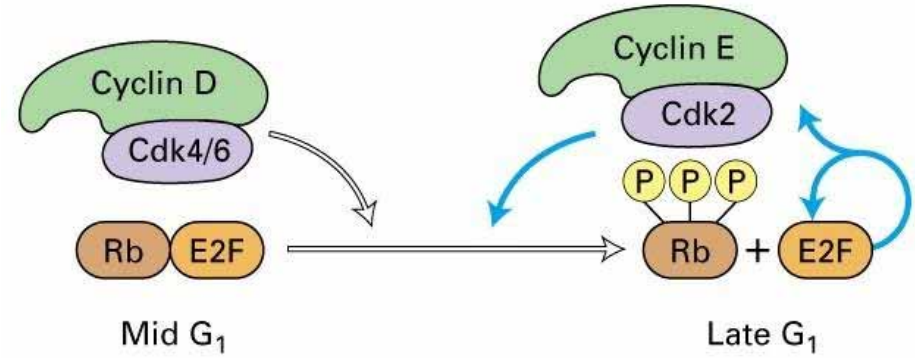


图13-22 Cyclin D与CDK结合使Rb释放结合的转录因子E2F

在G_1-S期，cyclinE与CDK2结合，促进细胞通过G_1/S限制点而进入S期。向细胞内注射CyclinE的抗体能使细胞停滞于G_1期，说明细胞进入S期需要CyclinE的参与。同样将CyclinA的抗体注射到细胞内，发现能抑制细胞的DNA合成，推测CyclinA是DNA复制所必需的。

在G_2-M期，cyclinA、cyclinB与CDK1结合，CDK1使底物蛋白磷酸化、如将组蛋白H_1磷酸化导致染色体凝缩，核纤层蛋白磷酸化使核膜解体等下游细胞周期事件。

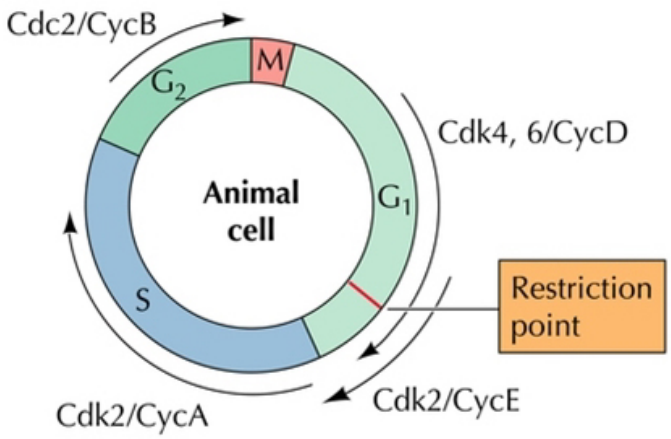


图13-23 Cyclin的周期性变化

在中期当MPF活性达到最高时，通过一种未知的途径，激活后期促进因子APC，将泛素连接在cyclinB上，导致cyclinB被蛋白酶体（proteasome）降解，完成一个细胞周期（图13-24）。

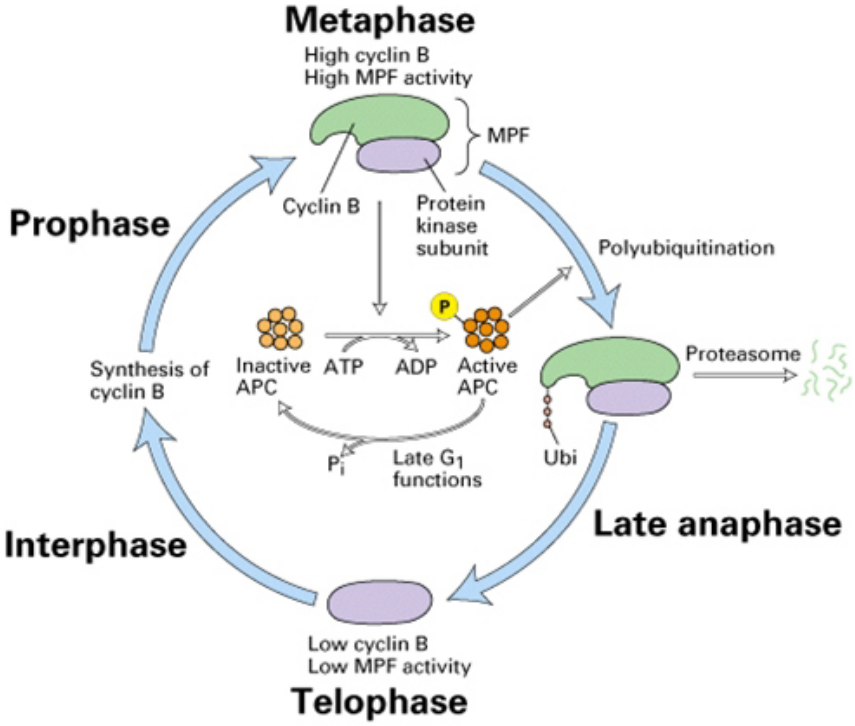


图13-24 Cyclin B的降解途径

分裂期周期蛋白N端有一段序列与其降解有关，称降解盒(destruction box，图13-25)。当MPF活性达到最高时，通过泛素连接酶催化泛素与cyclin结合，cyclin随之被26S蛋白酶体水解。G_1周期蛋白也通过类似的途径降解，但其N端没有降解盒，C端有一段PEST序列与其降解有关。

泛素由76个氨基酸组成，高度保守。共价结合泛素的蛋白质能被蛋白酶体识别和降解，这是细胞内短寿命蛋白和一些异常蛋白降解的普遍途径，泛素相当于蛋白

质被摧毁的标签。26S蛋白酶体是一个大型的蛋白酶，可将泛素化的蛋白质分解成短肽。

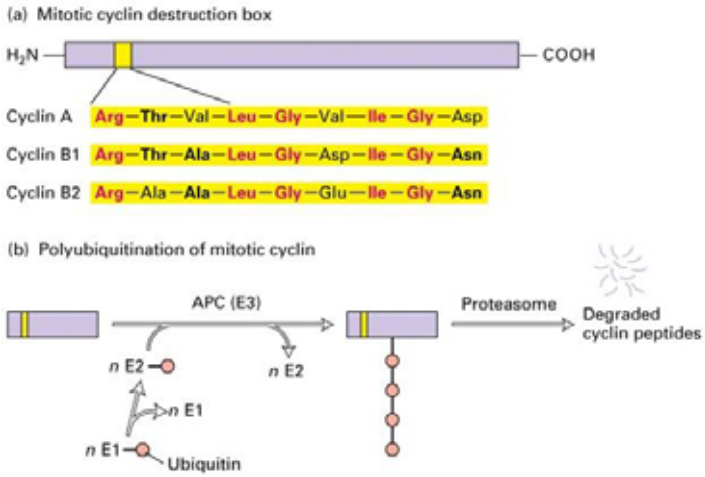


图13-25 细胞周期蛋白的降解盒与降解途径

在蛋白质的泛素化过程中（图13-25），E1（ubiquitin-activating enzyme，泛素激活酶）水解ATP获取能量，通过其活性位置的半胱氨酸残基与泛素的羧基末端形成高能硫酯键而激活泛素，然后E1将泛素交给E2（ubiquitin-conjugating enzyme，泛素结合酶），最后在E3（ubiquitin-ligase，泛素连接酶）的作用下将泛素转移到靶蛋白上。参与细胞周期调控的泛素连接酶至少有两类，其中SCF（skp1-cullin-F-box protein，三个蛋白构成的复合体）负责将泛素连接到G_1/S期周期蛋白和某些CKI上，APC(anaphase promoting complex)负责将泛素连接到M期周期蛋白上。

五、DNA 复制当且仅当一次

DNA的复制是由起始复制点（origins of replication）开始的，起始复制点也就是上一章提到的自主复制序列，散布在染色体上。在整过细胞周期中，起始复制点上结合有起始识别复合体（Origin recognition complex, ORC），其作用就象一个停泊点，供其它调节因子停靠。

CDC6是其中的一个调节因子，在G_1期CDC6含量瞬间提高，CDC6结合在ORC上，在ATP供能下，促进6个亚单位构成的MCM复合体和其他一些蛋白结合到ORC上，形成前复制复合体（pre-replicative complex，pre-RC），MCM实际上就是DNA解旋酶（helicase）。

S-CDK触发pre-RC的启动，同时阻止了DNA再次进行复制，因为S-CDK将CDC6磷酸化，使其脱离ORC，磷酸化的CDC6随后被SCF参与的泛素化途径降解；S-CDK还可以将某些MCM磷酸化，使其被输出细胞核。其它一些CDK也参与阻止pre-RC的再次形成，从而保证了DNA的复制当且仅当一次（图13-26）。

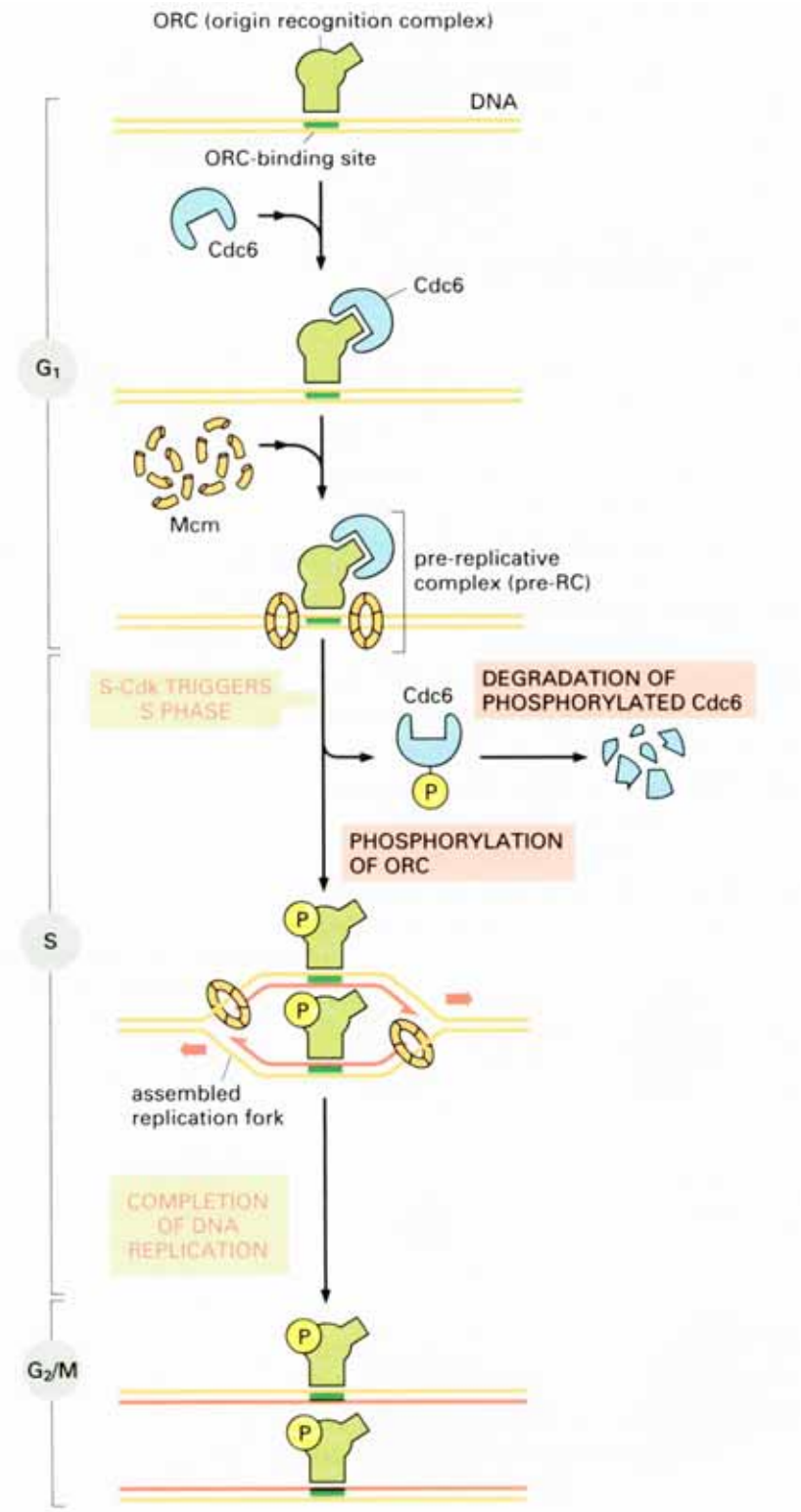


图13-26 每个细胞周期启动一次DNA复制（图片来自Molecular Biology of the Cell 4th ed.）

六、M 期 CDK 的激活

M 期 CDK 的激活起始于分裂期 cyclin 的积累，在胚胎细胞周期中 cyclin 一直在合成，其浓度决定于降解的速度；但在大多数细胞的有丝分裂周期中，cyclin 的积累是因为在 G_2-M 期 M-cyclin 基因转录的增强。

随着M-cyclin的积累，结合周期蛋白的M-CDK（CDK1）增加，但是没有活性，这是因为Wee1激酶将CDK1的Thr^{14}和Tyr^{15}磷酸化的缘故，这种机制保证了CDK-cyclin能够不断积累，然后在需要的时候突然释放。

在M期，一方面Wee1的活性下降，另一方面CDC25使CDK去磷酸化，去除了CDK活化的障碍。CDC2可被两种激酶激活，一是polo激酶，另一个是M-CDK本身。激活的M-CDK还可以抑制它的抑制因子Wee1的活性，形成一个反馈环。因此不难想象只要有少量的CDK被CDC25或polo激活，立即就会有大量的CDK被活化。

CDK的激活还需要Thr^{161}的磷酸化，它是在CDK激酶(CDK activating kinase CAK)的作用下完成的（图13-27）。

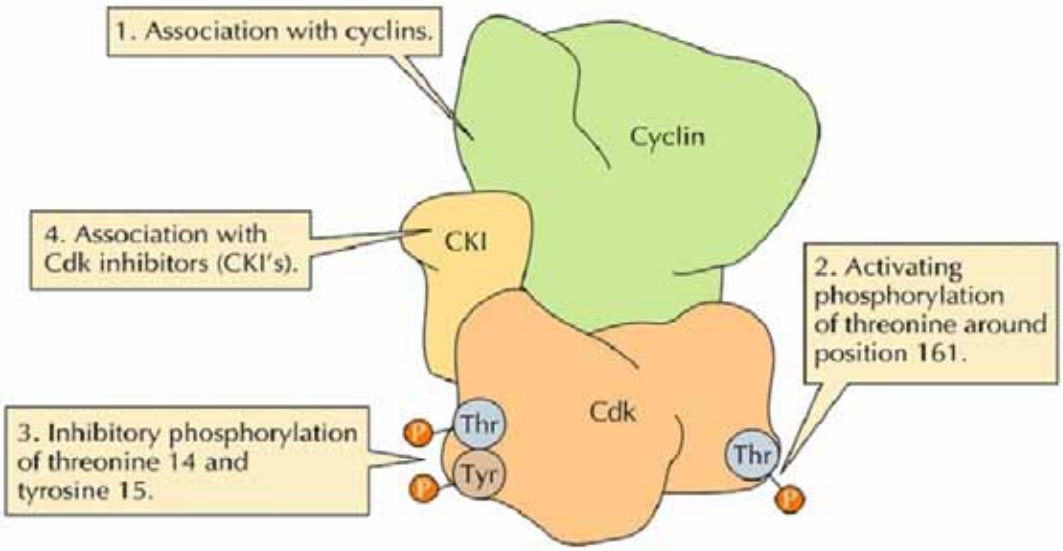


图13-27 CDK1的激活需要Thr^{14}和Tyr^{15}去磷酸化和Tyr^{161}的磷酸化

七、细胞周期检验点

细胞要分裂，必须正确复制DNA和达到一定的体积，在获得足够物质支持分裂以前，细胞不可能进行分裂。细胞周期的运行，是在一系列称为检验点（check point）的严格检控下进行的，当DNA发生损伤，复制不完全或纺锤体形成不正常，周期将被阻断。

细胞周期检验点由感受异常事件的感受器、信号传导通路和效应器构成，主要检验点包括（图13-28）：

G_1/S检验点:在酵母中称start点，在哺乳动物中称R点(restriction point)，控制细胞由静止状态的G_1进入DNA合成期，相关的事件包括：DNA是否损伤？细胞外环境是否适宜？细胞体积是否足够大？

S期检验点：DNA复制是否完成？

G_2/M检验点：是决定细胞一分为二的控制点，相关的事件包括：DNA是否损伤？细胞体积是否足够大？

中-后期检验点（纺锤体组装检验点）：任何一个着丝点没有正确连接到纺锤体上，都会抑制APC的活性，引起细胞周期中断。

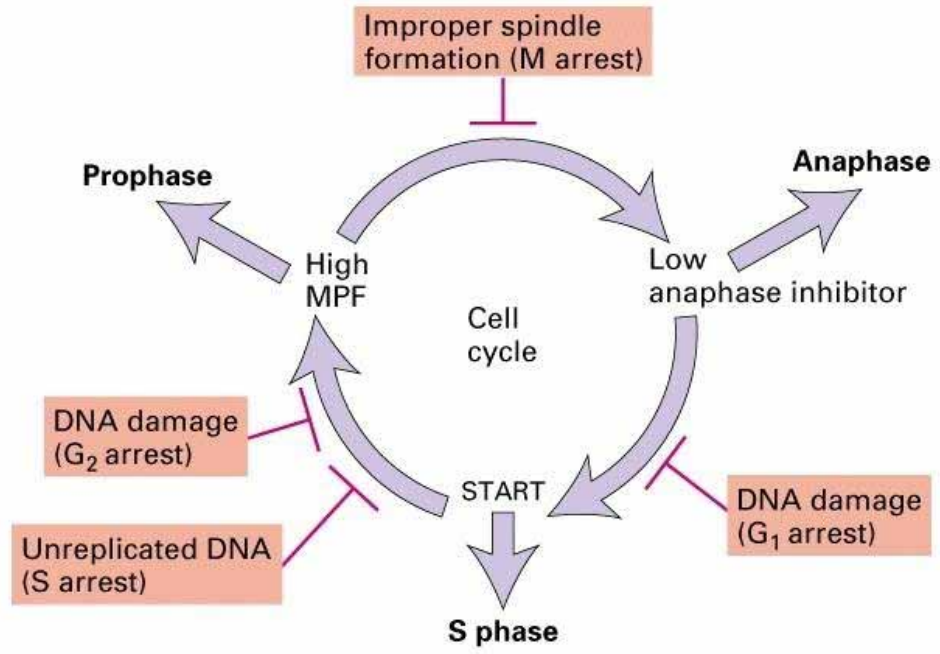


图13-28 四个主要的检验点

ATM（ataxia telangiectasia-mutated gene）是与 DNA 损伤检验有关的一个重要基因。最早发现于毛细血管扩张性共济失调症患者，人类中大约有 1%的人是 ATM 缺失的杂合子，表现出对电离辐射敏感和易患癌症。正常细胞经放射处理后，DNA 损伤会激活修复机制，如 DNA 不能修复则诱导细胞凋亡，总之不会形成变异的细胞。

ATM 编码一个蛋白激酶，结合在损伤的 DNA 上，能将某些蛋白磷酸化，中断细胞周期。其信号通路有两条。

一条是激活Chk1（checkpoint kinase）,Chk1引起CDC25的Ser^{216}磷酸化，通过抑制CDC25的活性，抑制M-CDK的活性，使细胞周期中断。

另一条是激活Chk2，使P53被磷酸化而激活，然后P53作为转录因子，导致P21的表达，P21抑制G_1-S期CDK的活性，从而使细胞周期阻断。

八、生长因子对细胞增殖的影响

单细胞生物的增值取决于营养是否足够，多细胞生物细胞的增值取决于机体是

否需要。这种需要是通过细胞通信来实现的。

生长因子是一大类与细胞增殖有关的信号物质，目前发现的生长因子多达几十种，多数有促进细胞增殖的功能，故又称有丝分裂原（mitogen），如表皮生长因子（EGF）、神经生长因子（NGF），少数具有抑制作用如抑素(chalone)，肿瘤坏死因子（TNF），个别如转化生长因子β(TGF-β)具有双重调节作用，能促进一类细胞的增值，而抑制另一类细胞。

生长因子不由特定腺体产生，主要通过旁分泌作用于邻近细胞。各种生长因子分子量大小不同，如：肝细胞生长因子(HGF)由674个氨基酸组成，分子量达80KD，内皮素仅由21个氨基酸组成。大多数生长因子仅由一条肽链组成，如EGF、TGF-α、FGF，而PDGF、NGF、TGF-β，肝细胞生长因子HGF由两条肽组成。

生长因子的信号通路主要有：ras途径，cAMP途径和磷脂酰肌醇途径。如通过ras途径，激活MAPK，MAPK进入细胞核内，促进细胞增殖相关基因的表达。如通过一种未知的途径激活c-myc，myc作为转录因子促进cyclin D、SCF、E2F等G1-S有关的许多基因表达，细胞进入G_1期（图13-29）。

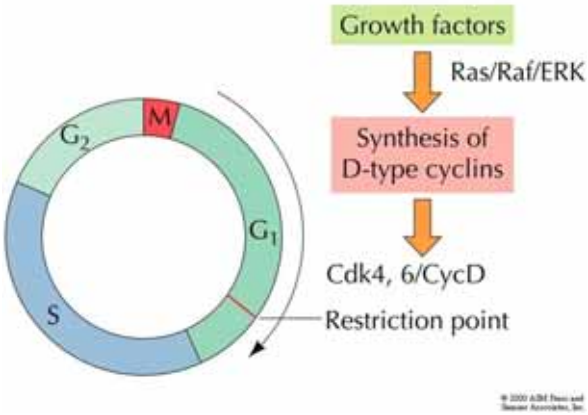


图13-29 生长因子的作用机理

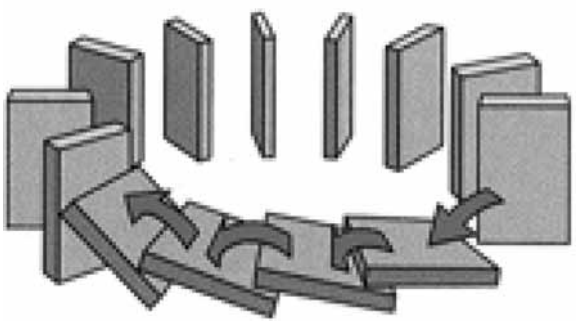


图13-30 细胞周期和其他的一些细胞生理过程就像多米诺骨牌

第十四章　细胞分化

在个体发育（ontogeny）中，细胞后代在形态结构和功能上发生差异的过程称为细胞分化（differentiation）。细胞分化不仅发生在胚胎发育中，而是在一生都进行着，以补充衰老和死亡的细胞，如：多能造血干细胞分化为不同血细胞的细胞分化过程。

个体发育是指一个新个体从产生到死亡的全部历程。对两性生殖的生物来说，新个体始于两性配子（精子和卵子）的结合——受精（fertilization）。卵子受精后启动发育程序，形成一个新个体的过程叫做胚胎发育（embryogenesis）。胚胎发育包括受精、卵裂（cleavage）、原肠胚形成（gastrulation）、神经胚形成（neurulation）、器官形成（organogenesis）等几个主要的发育阶段，许多动物还必须经过胚后发育阶段——变态（metamorphosis），才能发育为成体。

第一节 受精与胚胎发育

一、精子和卵的结构

在动物中精母细胞通过减数分裂后形成四个精细胞[22]，精细胞经过精子形成（spermiogenesis）的变态发育过程，排除大部分细胞质，内部发生一系列变化，成为精子。成熟的精子(spermatozoon)形似蝌蚪，分头、尾两部（图 14-1）。头内有一个高度浓缩的细胞核，核的前 2/3 有顶体覆盖（图 14-2）。顶体实质上是一个很大的溶酶体，内含多种水解酶，如顶体蛋白酶、透明质酸酶、酸性磷酸酶等。在受精时，精子释放顶体酶消化卵子外面的结构，进入卵内。精于尾部又称鞭毛(flagellum)，是精于的运动装置。尾部可分为颈段、中段、主段和末段四部分。颈段很短，其内有两个相互垂直的中心粒。其他三段内的主要结构是由中心粒发出的轴丝，由 9+2 排列的微管组成。中段短，在轴丝外包有线粒体鞘，为鞭毛的运动提供能量。主段长，没有线粒体鞘，代之以纤维鞘。末段短，仅有轴丝。个别动物如介壳虫的精子没有鞭毛。

[22] 个别动物只形成两个精子，如蚜虫，雄蚜的性染色体为 XO 型，精子发生时没有 X 染色体的次级精母细胞退化，最终形成两个 X 型的精子，后代全部发育为雌性，以后进行孤雌生殖，在秋季来临时，雌蚜又通过孤雌生殖产生雄蚜，进行两性生殖。

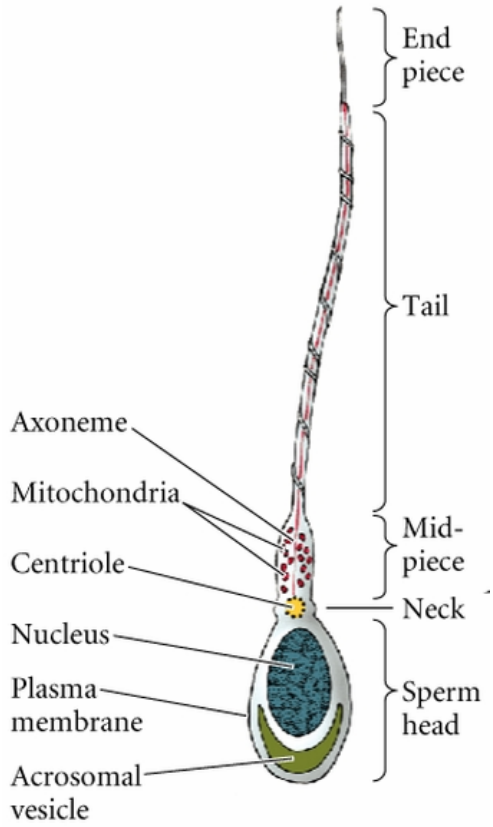


图 14-1 精子的结构模式图

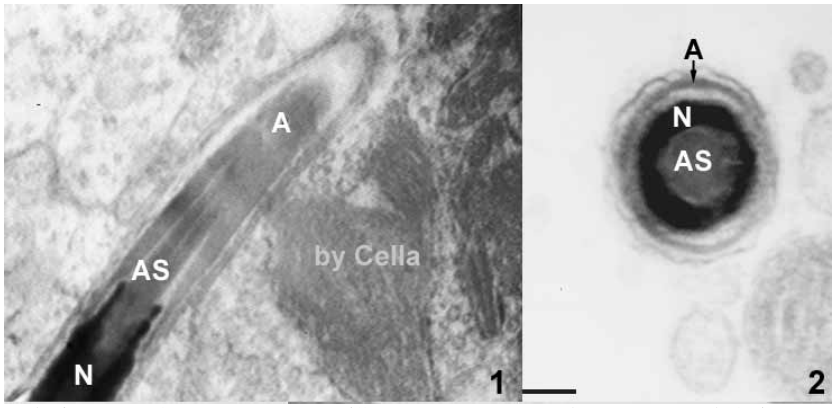


图 14-2 绍鸭精子头部的纵切（左）和横切（右）A：顶体；AS：顶体突起；N：细胞核

大多数动物的卵是一个大型的单个细胞，贮存有大量的营养供胚胎发育所用。卵的直径在人和海胆中约为 0.1mm，鱼类和两栖类中约为 1-2mm，鸟类中可以达到几厘米甚至十几厘米。卵的细胞质中富含蛋白质、脂类和多糖的营养成分称为卵黄（yolk），它们通常存在于卵黄颗粒中，有的种类中卵黄颗粒外还有膜包围。在体外孵化的种类中卵黄的体积可达卵的 95%以上。

卵的外面具有外被（coat），其成分主要是糖蛋白，是由卵细胞或其它细胞分泌的。在哺乳动物中这种外被叫做透明带（zona pellucida），其作用是保护卵子，阻止异种精子进入。许多卵的透明带下面（皮质部，cortex）还有一层分泌性的囊泡，

称为皮层颗粒（cortical granules），受精时以外排的方式释放皮层颗粒能引起透明带结构变化，形成受精膜，阻止其它精子进入。卵细胞实际上是停留在第一次或第二次减数分裂阶段的卵母细胞，直到受精以后，才完成减数分裂，并释放极体。人类从卵巢排出的卵子处于第二次成熟分裂的中期，在受精时才完成第二次分裂。若未受精，则于排卵后 12～24 小时退化。

二、受精

受精包括精子的获能（capacitation）、顶体反应（acrosome reaction）、皮层反应（cortical reaction）、原核形成和融合等过程（图 14-3）。

刚排出的精子虽有运动能力，但不能穿过卵子的放射冠和透明带，只有接受雌性生殖道的分泌物（获能因子），才具有受精能力，这种作用称为精子获能。在体外条件下，血清白蛋白（serum albumin）、高密脂蛋白（high-density lipoproteins）、氨基聚糖（glycosaminoglycans）、孕酮、钙离子载体（A23187）、ZP3、CO_2 等均可促进精子获能。获能后精子表面阻止受精的附睾蛋白和精浆蛋白被除去或改变，质膜胆固醇流失，与卵子结合的受体暴露。获能期间，钙通道被激活、耗氧量和糖酵解明显增加，pH 升高，腺苷酸环化酶激活，导致胞内 cAMP 含量升高，蛋白激酶 A 活化，精子活力增加，顶体酶原转化为有活性的顶体酶。

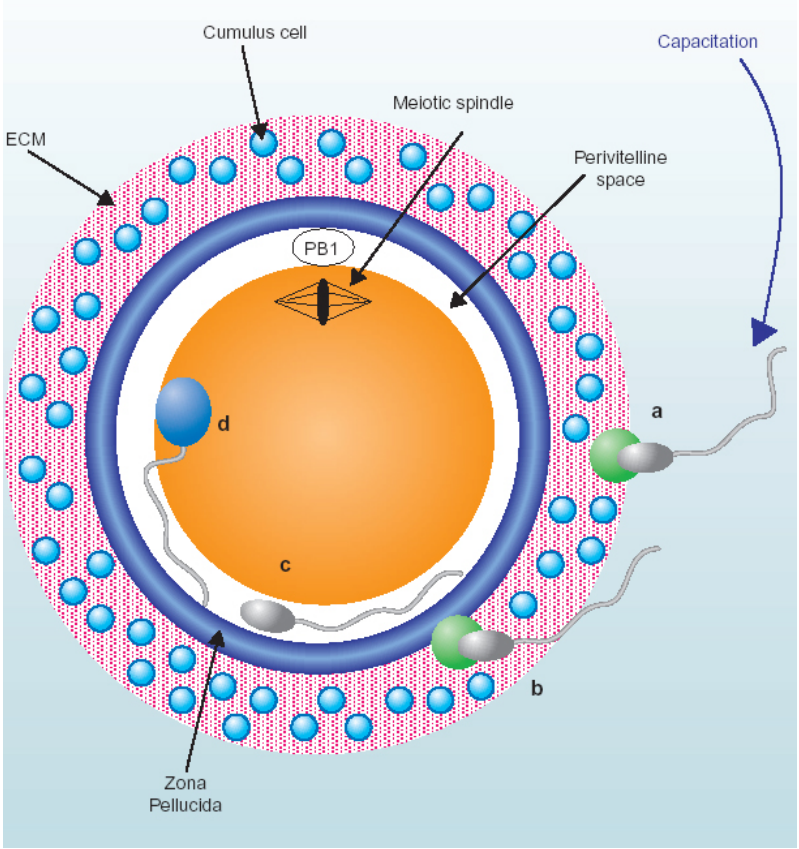


图 14-3 受精的早期事件 引自 Janice P. Evans 2002

获能的精子首先借助头后部（顶体后区）质膜 PH-20 的透明质酸酶活性穿过卵母细胞外卵丘细胞层，到达透明带，然后精子通过头前部（顶体区）质膜表面的 ZP 结合蛋白与卵母细胞透明带发生识别，完成结合过程，诱发顶体反应，即：顶体以外排的方式释放出水解酶，将卵子的透明带和卵黄膜溶解，形成精子穿过的通道。在海胆中此时精子的前端在微丝的作用下还会形成顶体突起（哺乳动物不具有）。

精子进入卵子后，导致卵膜去极化，动作电位由受精点传至膜表面，使精子受体失活。在精子接触点上，磷脂酰肌醇信号途径启动，产生DAG和IP3。DAG激活蛋白激酶C，启动DNA的复制。IP3导致内质网中的钙离子释放，钙浓度呈有规律的跃迁，称为钙波。钙信号进而引起皮层反应，即：卵细胞膜下的皮层颗粒（内含酶类的囊泡），以外排的方式，进入卵黄膜和卵膜之间的腔隙，酶类引起透明带“硬化”，形成受精膜。

精子的刺激使处于休眠状态的卵子被激活，重新回到减数分裂阶段，迅速完成第二次分裂，释放极体。此时精子和卵子的细胞核分别称为雄原核（male pronucleus）和雌原核（female pronucleus）。两个原核逐渐在细胞中部靠拢，核膜随即消失，染色体混合，形成二倍体的受精卵（fertilized ovum），又称合子（zygote）。

通常一个卵子和一个精子结合，多精进入会形成多余的分裂极和纺锤体，导致细胞异常分裂而使胚胎发育终止。受精后通过两种机制阻止多精进入，一是膜瞬间去极化；二是通过皮层反应，破坏精子受体和形成受精膜。受精后精子的核、中心粒（鞭毛基粒）和线粒体均注入卵中。线粒体之所以表现为母系遗传，是因为受精卵中只有仅母本线粒体可以存活。

许多昆虫、软体动物、软骨鱼、有尾两栖类、爬行类和鸟类在受精时有多于一个精子进入卵内，但只有一个雄原核与雌原核发生融合，参与发育，其余的精核逐渐退化消失。有时多余的精于也发生一些畸形的分裂，但不妨碍正常卵裂和发育。这种多精受精称为生理性多精受精。

三、精卵识别

自然环境中，几种海胆的精子可以接触一个卵子，产生顶体反应，但异种精子不能与卵子融合，这是因为精子表面的结合素能与卵细胞膜上特异的受体结合，而达到同种识别的目的。

在哺乳动物小鼠中，精卵的识别同样涉及表面糖蛋白之间的相互作用，通常把卵子透明带中与精子结合的蛋白（ZP）叫做精子受体，而把精子表面与ZP结合的蛋白叫做卵结合蛋白。

小鼠透明带中有三种糖蛋白，命名为ZP1、ZP2、ZP3，分子量分别为200、120和83KD。ZP2和ZP3形成异二聚体，ZP1与二聚体交联，形成三维网状结构。ZP3是第一精子受体，能诱发顶体反应。用ZP3蛋白处理精子，则失去受精能力。

β1，4-半乳糖转移酶-I（β1，4-galactosyltransferase，GalTase）[23]是精子表

[23] 之所以这样命名是因为它们在高尔基体中合成时，能以尿苷二磷酸半乳糖(**UDP-Gal**)为供体，将糖基转移到糖蛋白上。

面负责与ZP3结合的蛋白（图14-4）。GalTase-I能结合ZP3糖链末端的N-乙酰葡糖胺（N-acetylglucosamine）残基，实验证明纯化的GalTase-I及其抗体均抑制精卵结合。GalTase-I能激活G蛋白，引起精子顶体反应，GalTase-I基因敲除的小鼠其精子缺乏顶体反应和穿越透明带的能力。

精子穿过透明带，到达卵周隙后位于精子头后部质膜的受精素（fertilin，也叫ADAM）与卵母细胞质膜上的整合素发生识别和结合[24]（图 14-5），并启动精子与卵母细胞的质膜融合系统，最终实现受精过程。

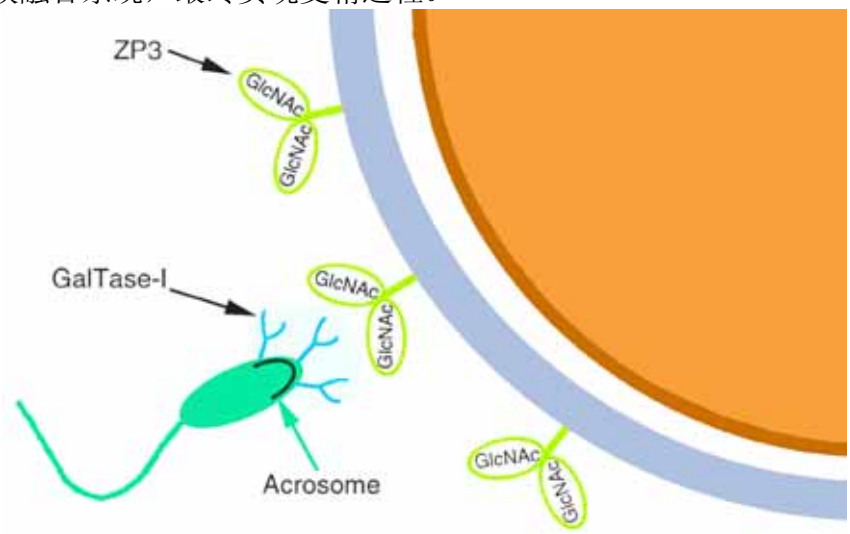


图14-4 ZP3与GalTase 引自D. J. Miller 2000

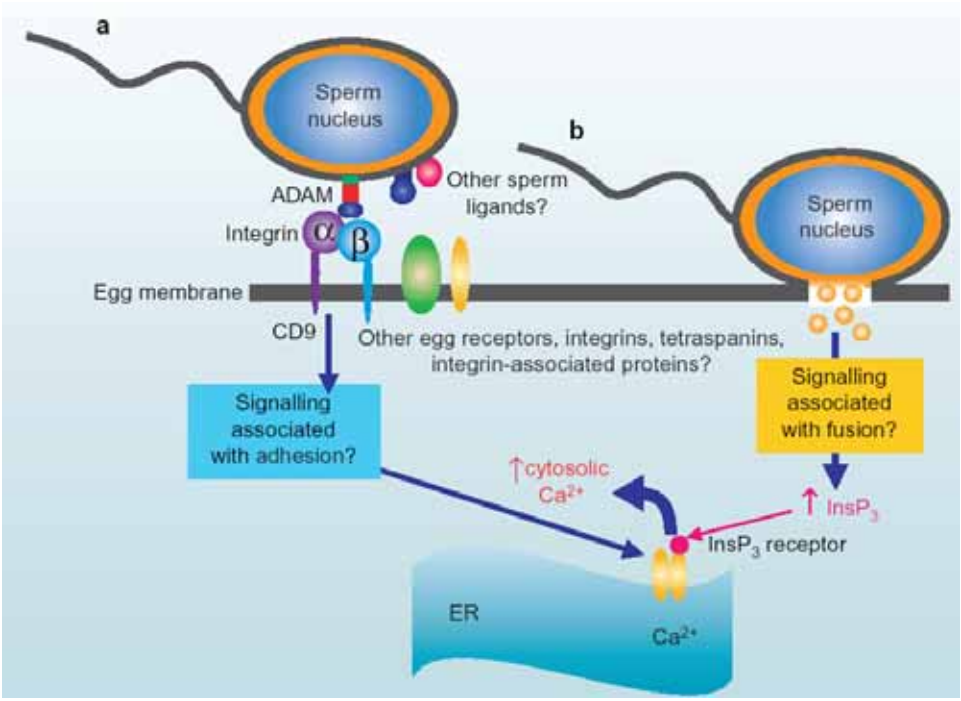


图 14-5 精子和卵子细胞膜的相互作用，引自 Janice P. Evans 2002

[24] 需要卵子中的 CD95 参与，CD95 敲除的的小鼠，其卵子不能与精子结合。

四、卵裂与胚胎发育

卵裂（cleavage）是指受精卵经过分裂，将卵质分配到子细胞的过程，分裂产生的细胞叫做分裂球(blastomere)。卵裂和一般有丝分裂相似，但不经过间期，所以卵裂期间仅仅是细胞数目的增加，不伴随着细胞生长。随着细胞数量增加，子细胞的核质比逐渐增大，直到接近正常核质比时，分裂球才开始生长，进入到一般的有丝分裂过程。

卵裂的方式与卵黄含量和分布有关，较大、卵黄较多的卵是以偏裂的方式进行的（如昆虫的表面卵裂），反之多以均裂的方式进行（如哺乳动物的卵）。分裂面与卵的极轴[25]一致的卵裂称为经裂（meridional cleavage），与极轴垂直的称为纬裂(latitudinal cleavage)。卵裂方向和纺锤体的方向有关，细胞质成分和环境信号均可以影响纺锤体的方向。

两栖类的卵受精后两小时就开始卵裂，第1、2次为经裂，第3次为纬裂，不对称，在动物极形成4个较小的细胞，在植物极形成4个较大的细胞。

哺乳动物的卵裂较慢，受精1天后才开始卵裂，8细胞之前，分裂球之间结合比较松散，8细胞之后突然紧密化（compaction），即：通过细胞连接形成致密的球体。16细胞期，内部1-2个细胞属于内细胞团，将来发育为胚胎，而其外周细胞变为滋养细胞，不参与组成胚胎结构，而是参与形成绒毛膜。

通常动物的胚胎在64细胞以前为实心体，称为桑椹胚，在128细胞阶段，细胞团内部空隙扩大，成为充满液体的囊胚腔（blastocoel），此时的胚胎称为囊胚。

囊胚继续发育，部分位于外表面的细胞通过各种细胞运动方式(如：移入、内卷、内陷)进入内部从而形成一个二层或三层的原肠胚。这种细胞迁移运动过程称为原肠形成(gastrulation)。留在外面的称为外胚层(ectoderm)，迁移到里面的称为内胚层(endoderm)或中、内胚层(meso-endoderm)。原来的囊胚腔亦随原肠腔的形成而逐渐消失。

三胚层形成的组织和器官有：外胚层形成神经系统、表皮、皮肤腺、毛发、指甲、爪和牙齿等；中胚层形成骨骼、肌肉、泌尿生殖系统、淋巴组织、结缔组织、血液；内胚层形成呼吸系统、消化道、肝、胰。

第二节 细胞分化的主要机制

前面提到细胞分化是指细胞后代在形态结构和功能上发生差异的过程，通过细胞分化，使具有相同遗传组成的细胞，选择性地表达不同的基因，产生不同的结构蛋白、执行不同的功能，共同参与构成一个复杂的细胞社会——个体，所以细胞分化的实质是基因的差别表达（differential expression）。细胞分化与形态发生（morphogenesis）是相互联系在一起的，后者是指通过细胞的增殖、分化和行为（如粘附、迁移、凋亡）塑造组织、器官和个体形态的过程。

[25] polar axis，卵的南北极方向，也叫卵轴

随着细胞的分裂和分化，细胞的发育方向逐渐被限定，当尚未定向的细胞不可逆地转变为某种定向细胞的时刻，细胞的命运就被固定了，因而也称之为决定（determination），如哺乳动物桑椹胚的内细胞团和外围细胞，前者形成胚胎、后者形成滋养层。

不同种属动物，其早期胚胎细胞出现决定的时间不同。无脊椎动物早期的卵裂球已经决定，每个卵裂球可以形成身体的一部分，但是任何一部分卵裂球都不能发育为完整的个体。而哺乳类胚胎在 8 细胞期以内，任何一个细胞都具有发育为一个个体的能力，即使在 16 细胞期，仍可发现个别细胞具有独立发育成新个体的能力。

细胞分化的机理及其复杂，概括而言细胞的分化命运取决于两个方面：一是细胞的内部特性，二是细胞的外部环境，前者与细胞的不对称分裂（asymmetric division）以及随机状态有关，尤其是不对称分裂使细胞内部得到不同的基因调控成分，表现出一种不同于其它细胞的核质关系和应答信号的能力；后者表现为细胞应答不同的环境信号，启动特殊的基因表达，产生不同的细胞的行为，如分裂、生长、迁移、粘附、凋亡等，这些行为在形态发生中具有极其重要的作用。

以下我们对细胞的不对称分裂、诱导机制、细胞数量控制、细胞行为变化等分化和发育的主要机制作简要地介绍。

一、不对称分裂

动物受精卵并不是均一结构，而是具有高度的异质性。首先，卵母细胞的核并不位于中央，而是在细胞外周靠近表面的地方，极体就是从这里形成并释放出长的（图 14-3），通常把极体释放的位点称为北极或动物极，而相对的一极称为南极或植物极。其次，卵细胞中的蛋白质、mRNA 并非均匀分布的，而是定位于特定的空间。

动物卵细胞中，贮存有 2-5 万种不同的 mRNA，专供受精卵的启动、分化和发育之用，用转录抑制剂放线菌素 D 处理海胆受精卵，使 RNA 的合成受到抑制，胚胎发育仍能进行至囊胚期，但如用蛋白质翻译抑制剂嘌呤霉素或亚胺环己酮处理受精卵，则受精卵完全停止分化发育。

卵的异质性使卵的分裂必然是不对称的，不同的子细胞得到的“家产”不同，因此具有不同的分化命运，例如昆虫是以表面卵裂的方式形成胚层细胞的，迁入卵的后端极质部的细胞发育为原始生殖细胞，用紫外线照射卵的这一区域，破坏极质，将会发育为无生殖细胞的不育个体。

在胚胎发育阶段，不对称分裂是常见的现象，如果蝇神经系统发生时，成神经细胞经过连续不对称分裂，像出芽的一样产生一些小细胞，这些小细胞是神经节母细胞（ganglion mother cells），再经过一次分裂形成神经元或神经胶质细胞。在哺乳动物中，干细胞的分裂也是不对称的，产生一个祖细胞和另一个干细胞，祖细胞只具有有限的自我更新能力，只能分化为终端细胞。

二、诱导机制

诱导（induction）就是一部分细胞诱导其它细胞向特定方向分化的现象，也叫胚胎诱导（embryonic induction），对其它细胞起诱导作用的细胞称为诱导者（inductor）或组织者，如脊索可诱导其顶部的外胚层发育成神经板，神经沟和神经管。这种诱导是通过信号来实现的，其中有些诱导信号是短距离的，仅限于相互接触的细胞间；有些是长距离的，通过扩散作用于靶细胞。通常把响应诱导信号的同类细胞叫做形态发生场（morphogenetic field）。除了上述的典型的诱导方式外，还有其它一些方式，如：级联信号（cascade signaling）、梯度信号（gradient signaling）、拮抗信号（antagonistic signaling）、组合信号（combinatorial signaling）、侧向信号（lateral signaling）等（图 14-6）。

表 1 一些诱导信号

信号途径	配体	受体	拮抗物
受体酪氨酸激酶	EGF	EGF 受体	Argos
	FGF（branchless）	FGF 受体	
	ephrins	Eph 受体	
TGFβ 家族	TGFβ	TGFβ 受体	
	BMP（Dpp）	BMP 受体	Chordin(sog)，noggin
	Nodal		
WNT	WNT	Frizzled	Dikkopf，sFRP，Cerberus
Hedgehog	Hedgehog		
Notch	Delta	Notch	Fringe

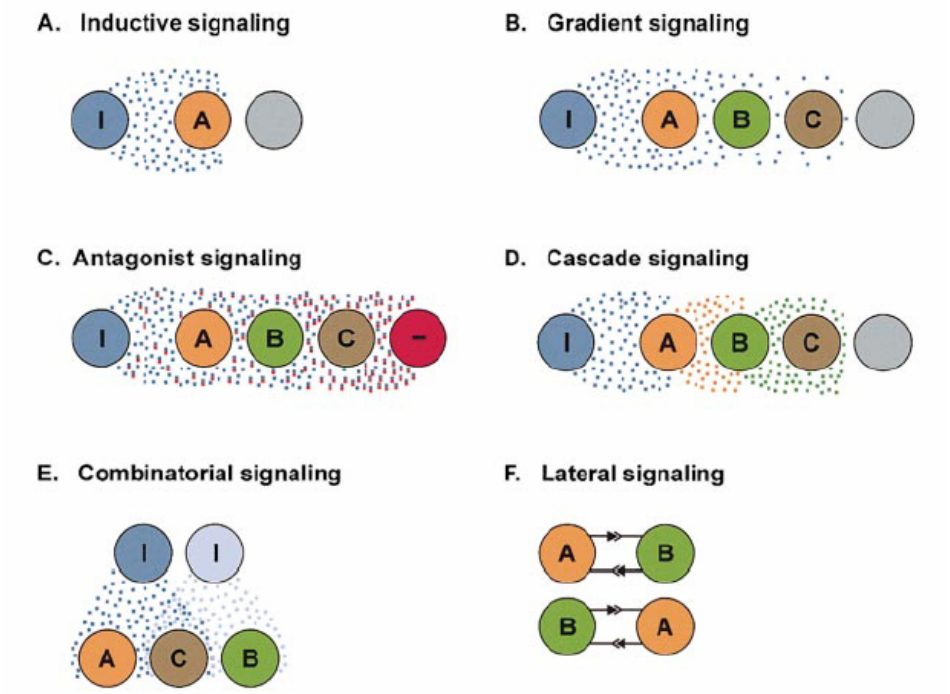


图 14-6 诱导信号的作用方式 引自 Thomas Edlund and Thomas M. Jessell 1999

级联信号：初级诱导产生的组织又可以诱导其他组织的分化，产生逐级的诱导过程，最典型的事例是视胞可诱导其外面的外胚层形成晶体，而晶体又可诱导外胚层形成角膜。

梯度信号：外界信号呈梯度分布，细胞具有不同的响应阈浓度，导致不同的分化命运，随着外界信号浓度高低的不同，细胞的分化结果也不同，通常把在一个细胞或一个形态发生场中，按浓度梯度决定胚胎分化形式的信号分子叫做成形素（morphogen）。在果蝇中，胚胎的前后轴和背腹轴就是通过这种梯度信号来控制的。

拮抗信号：细胞分泌物能与某些信号途径的配体或受体结合，阻断信号途径。令人感到惊讶的是，许多形态发生的事件竟然是由信号系统的拮抗分子引起的，例如蛙类神经系统的形态发生场，即可发育为神经细胞、也可发育为上皮细胞，其诱导者释放 Chordin，能促进神经细胞的分化，但是 Chordin 并没有自己的信号途径，而是抑制 BMP/TGFβ 信号途径，后者能促进上皮细胞的发育。

组合信号：一种信号分子决定靶细胞的一种分化命运，而两种信号分子则引起另外一种分化途径。

侧向信号：细胞间的信号分子只有细微水平的差别，通过快速的反馈调节，使信号放大，决定了细胞的分化特性。如 Notch 信号途径在果蝇中可以触发侧向抑制（lateral inhibition），使正在分化的神经元周围的前体细胞不再分化为神经元，而发育成上皮细胞。当 Notch 或其配体功能缺陷时，这种侧向抑制消失，神经元产生过多，导致胚胎死亡。

必须说明的是并不是所有的分化事件都是诱导（或细胞的环境信号）引起的，有些和细胞自身的特性有关，也就是自发机制（autonomous mechanism）。譬如，前边提到的卵的异质性和不对称分裂，就是典型的事例；还有一种情况是细胞的随机状态不同，也会造就分化命运的不同，例如哺乳动物胚胎直到 8 细胞期，各个细胞在形态和分化潜能上没有本质的区别，紧密化后处于内部的细胞将来形成内细胞团，进一步发育为胚胎，而处于外部的只能发育为滋养层。将小鼠 4 细胞期的分裂球，移植到紧密化后的细胞团外部，这些细胞也只能发育为滋养层。从这个例子上我们不难推测在组织和器官的构建中，可能也存在着同样的现象。

三、细胞数量控制

我们很容易回答人比老鼠大是因为人的细胞多，但却很难回答为什么人的细胞多，以及不同的器官为什么具有各自相对恒定的细胞数目？细胞数量控制不仅是发育中形态构建的重要机制，也是成体形态维持的重要机制。细胞数量主要取决于细胞分裂和细胞死亡，这两者都受外界信号的调节。

（一）刺激细胞分裂

早期的卵裂可以看作是一种自发机制，但是大多数情况下细胞分裂都依赖于外

界信号的刺激，所以也属于诱导机制，这种方式意味着在一个细胞社会中，一个细胞只有在当别的细胞（或者说社会）需要它增殖的时候，它才开始增殖。刺激细胞分裂的信号分子主要有：各类细胞因子（如肽类生长因子）、激素和细胞外基质成分。在体外，细胞在没有生长因子的培养基中周期将会停在G1/S交界处(R点)，转变为G_0期细胞。

1．肽类生长因子

肽类生长因子主要通过旁分泌的方式作用于靶细胞，最最有代表性的信号途径是RPTK-ras途径，被激活的MAPK进入细胞核，促进细胞增殖相关基因的表达。Pulkkinen等（2003）发现成纤维生长因子及其受体在胰腺原基的生长和分化中起重要的作用，敲除Fgfr2b（成纤维生长因子受体2）基因的小鼠，胰腺明显较小，导管发育受阻。在体外培养时，加入外源的Fgfr2b配体，则刺激胰腺导管细胞的增殖而抑制内分泌细胞的分化。

肽类生长因子可能也存在自分泌的方式作用于同类细胞。很早以前人们发现小鼠胚胎胰腺原基在体外进行组织培养时，可发育成具有功能的胰腺组织，但如果把胰原基切成 8 小块分别培养，则都不能形成胰腺组织，再把分开的小块合起来，又可形成胰腺组织。推测[26]可能是细胞数量不足，导致自分泌或旁分泌信号不足，使增殖和分化受到抑制。

肿瘤可以看作是机体的异常发育，在肿瘤形成方面也具有同样的现象，Fisher 和 Fisher（1967）将大量的肿瘤细胞注射到小鼠的门静脉，结果引起广泛的肝脏转移，小鼠短期内死亡。但是只注射 50 个肿瘤细胞时，小鼠处于明显的无瘤状态下生存，进行手术检查也未发现任何肿瘤。手术后关腹（缝合伤口）饲养，却发现小鼠很快因肝肿瘤大量增生而死亡，这是因为手术后伤口愈合时会分泌大量生长因子，刺激细胞增殖以修复伤口，同时生长因子也会作用于肿瘤细胞。这个现象说明了肿瘤细胞只有在达到临界数量后，会由于自分泌生长因子而引起爆发式的增殖。

2．激素

激素可看作是远距离细胞间的相互作用，虽然激素分布在整过循环系统，但它只作用于特定的靶细胞，促进其生长和分化。最典型的事例是性激素对性分化的影响，在雄性哺乳动物中，睾丸分泌的激素能促进乌尔夫氏管[27]的发育，而抑制缪勒氏管[28]的发育，摘除胚胎睾丸，则促进谬勒氏管的发育，形成雌性生殖管道。再如昆虫的保幼激素和脱皮激素，前者的功能是保持幼虫特征，促进成虫器官原基的发育，后者的功能是促进脱皮和成虫形态的出现，当两者保持一定的比例时，幼虫脱皮而长大，当保幼激素含量减少或不合成时，幼虫化蛹，成虫器官发育，最后变为成虫。成虫期又开始合成保幼激素，促进性腺的发育。

3．细胞外基质

细胞外基质能引起特定细胞的增殖和分化。细胞外基质中能与细胞表面的整合素相互作用，激活粘着斑激酶（FAK），FAK 可以通过接头蛋白 Grb2（growth receptor bound protein 2）启动 Ras 信号途径，引起细胞增殖。

在实验条件下，细胞外基质对干细胞的增殖和分化具有诱导作用，如干细胞在

[26] 没有看到文献记载，仅仅是作者的推测。
[27] 进一步发育为雄性的附睾、输精管和贮精囊。
[28] 进一步发育为雌性的子宫、输卵管和上阴道。

IV 型胶原和层粘连蛋白上演变为上皮细胞；在 I 型胶原和纤粘连蛋白上形成纤维细胞；在 II 型胶原及软骨粘连蛋白上发育为软骨细胞。在发育与创伤组织中，透明质酸合成旺盛，能促进细胞的增殖和迁移，阻止细胞的分化，一旦细胞增殖够数则透明质酸被水解，取而代之的是硫酸皮肤素，硫酸软骨素等其它形式的氨基聚糖。

（二）抑制细胞分裂

胚胎时期至少有两种途径抑制细胞的分裂，一是下调刺激信号（如肽类生长因子）的水平，二是抑制细胞周期引擎。在肌肉发生（myogenesis）过程中，属于 TGF-β 超家族的肌肉抑制素（myostatin）是肌肉生长的负调控因子，自然界 myostatin 基因突变的动物会出现肌肉加倍的表型（“double-muscled” phenotype），该基因剔除的小鼠肌肉组织重量增加 2-3 倍。肌肉抑制素抑制成肌细胞的增殖是通过上调细胞周期素依赖性蛋白激酶 CDK2 的抑制因子 p21 和下调 CDK2 来实现的，CDK2 活性不足，使 Rb 不能释放转录因子 E2F，导致细胞不能从 G1 期进入 S 期（图 14-7）。Myostatin 是由肌肉细胞分泌的，当肌肉细胞的数量增多后，则抑制细胞的分裂。Myostatin 在胚胎时期表达水平较高，但在在成年动物中的表达水平很低，其过度表达会引起肌肉萎缩。

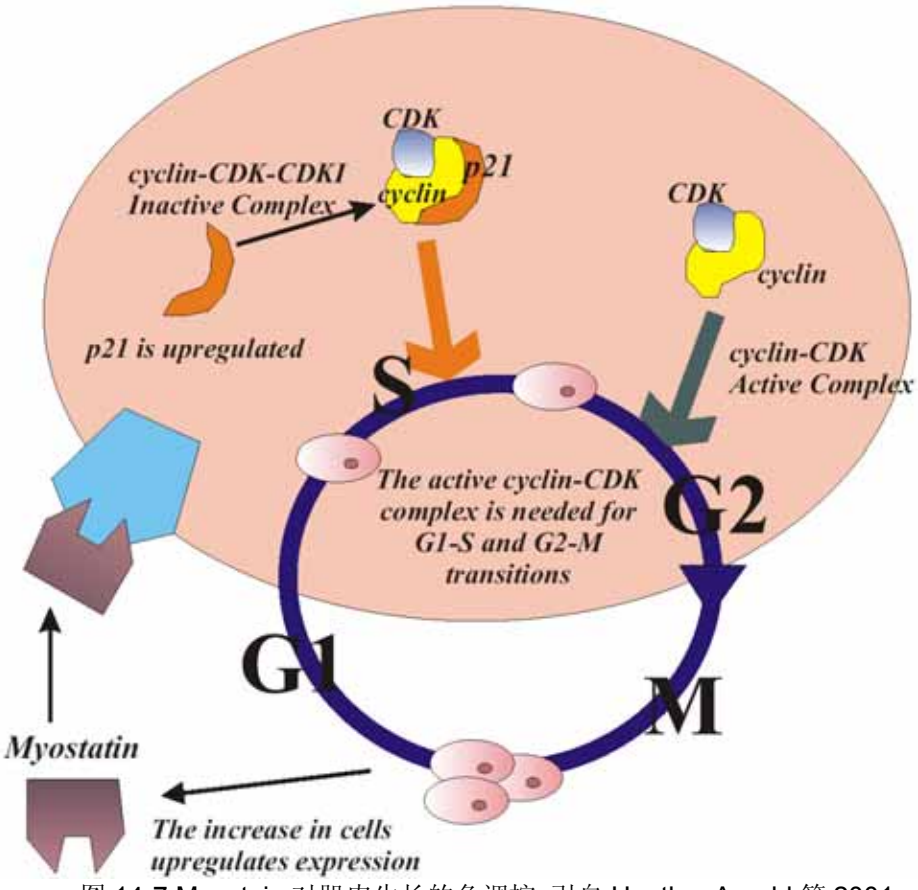


图 14-7 Myostain 对肌肉生长的负调控 引自 Heather Arnold 等 2001

很早以前人们就发现用含有成蛙心组织的培养液培养蛙胚，则蛙胚不能发育出

正常的心脏，称为“分化抑制”现象，认为是由于（抑素 chalone）引起的。今天看来这种所谓的“抑素”可能就是 Myostatin 之类的物质。

（三）细胞凋亡

在发育中，前体细胞只进行有限次的分裂，就进入终末分化状态了。在体外培养时，即使长寿命的细胞，如成纤维细胞最后终将走向衰老和死亡，可见细胞进入终末分化和凋亡，也是控制细胞数量的一个重要途径。

细胞凋亡（apoptosis）也叫细胞程序性死亡（programmed cell death，PCD）是指在胚胎发育中有些细胞注定要死亡，这种细胞行为在数量控制和形态塑造中都具有重要的意义。就象细胞的增殖需要信号刺激一样，细胞的存活也需要信号来维持，说明在一个细胞社会中，细胞的存活同样取决于“社会”是否需要它。在动物的神经系统发育中，最初生成的神经细胞的数目远比以后存留的数目多，是因为那些未能与靶细胞或靶组织建立连接的神经元都会发生凋亡而消失。

四、细胞行为

外界信号和细胞的固有特征，不仅决定了细胞内部的基因表达，而且还影响细胞的行为，使其参与形态的构建和进一步的分化。这些行为主要包括定向分裂（directed mitosis）、差别生长（differential growth）、细胞凋亡（apoptosis）、细胞迁移（migration）、区别粘附（differential adhesion）、细胞收缩（contraction）、基质膨胀（Matrix swelling）、细胞连接（gap junction）和细胞融合（fusion）等（图 14-8），以下就这些细胞行为作简单的介绍，关于细胞凋亡我们将在第十五章讲解。

定向分裂：细胞外的信号（如 WNT）能够影响纺锤体的方向，使细胞沿着某一方向定向分裂，使新产生的细胞定位于某个区域，通常与不对称分裂有关，例如，果蝇脑发育过程中，神经外胚层细胞通过定向分裂产生两个细胞，一个位于基部变为成神经细胞，另外一个演变为成上皮细胞（epidermoblast）。

差别生长：原先存在的图式（pattern），由于不同部位的细胞，以不同的速度分裂，塑造组织或器官的形态，在脊椎动物骨形态发生时，长骨生长板就存在这种现象。

细胞迁移：是细胞或细胞群由一个区域迁到另一区域的过程的现象，是器官和组织发生过程中所不可缺少的。最典型的例子是原始生殖细胞（primordial germ cell，PGC）的迁移现象，PGC 并不是由生殖原基产生的，在不同的生物中它们以不同的方式迁移到生殖原基，如在小鼠中原始生殖细胞首先出现在胚外中胚层，然后出现在尿囊区，再沿着尿囊区和肠道向生殖脊移动；再如多功能的神经嵴细胞，由神经管的背侧方迁移到脊髓的腹侧方形成神经节，迁移到肾上腺形成肾上腺髓质，迁移到皮肤形成色素细胞。

区别粘附：指细胞通过表面的糖蛋白与其它细胞表面的糖蛋白或细胞外基质之间相互作用，形成暂时或稳定的细胞连接。其作用至少包括：①通过选择性的粘附，

同类或相关细胞按一定的模式聚集在一起，构成组织；②通过区别粘附形成突起、内陷、囊腔、基板等结构；③通过与周围的细胞或基质不断的粘附和去粘附实现细胞的迁移；④表皮——间叶细胞转换也是通过区别粘附实现的。

细胞收缩：是由肌动-蛋白肌球蛋白系统实现的，组织形态的弯曲、外凸和内陷与细胞收缩有关。如两栖类的原肠化过程中，瓶状细胞的收缩是牵引植物极细胞向内运动的一个重要方面，在体外可以观察到蝾螈早期原肠胚的瓶状细胞能够牵引与之相连的细胞的运动。

基质膨胀、沉积和消失：细胞外基质是机体形态构建不可缺少的，如在海胆的原肠形成时，植物极细胞向卵的透明层分泌硫酸软骨素蛋白聚糖，这种分子能够大量吸水膨胀，而其外边的透明层不膨胀，结果就像加热的双层金属片一样发生弯曲，从而完成初期的原肠化。

细胞融合：如肌细胞就是由成肌细胞融合而成的合胞体（图 14-9）。

间隙连接：细胞之间通过间隙连接，来协调分化，是最常见的一种形式。在小鼠胚胎的 8 细胞阶段，细胞之间普遍建立了电偶联，当细胞开始分化后不同细胞之间的电偶联逐渐消失，说明间隙连接存在于发育与分化的特定阶段的细胞间。用连接蛋白的抗体处理 8 细胞阶段的胚胎，则引起异常发育，推测间隙连接具有提供“位置信息”的作用。

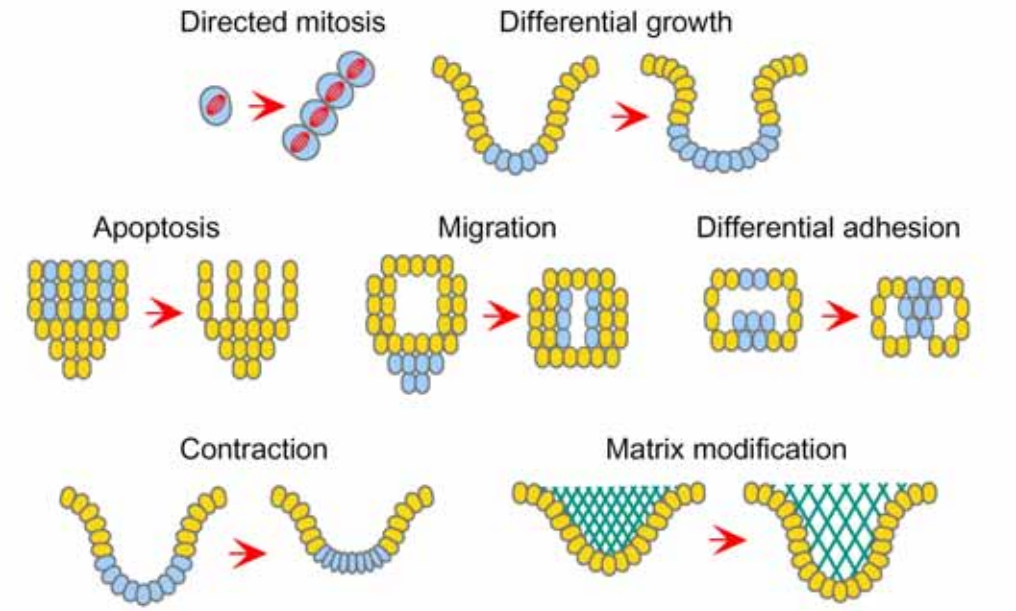


图 14-8 发育中的细胞行为 引自 Salazar-Ciudad 等（2003）

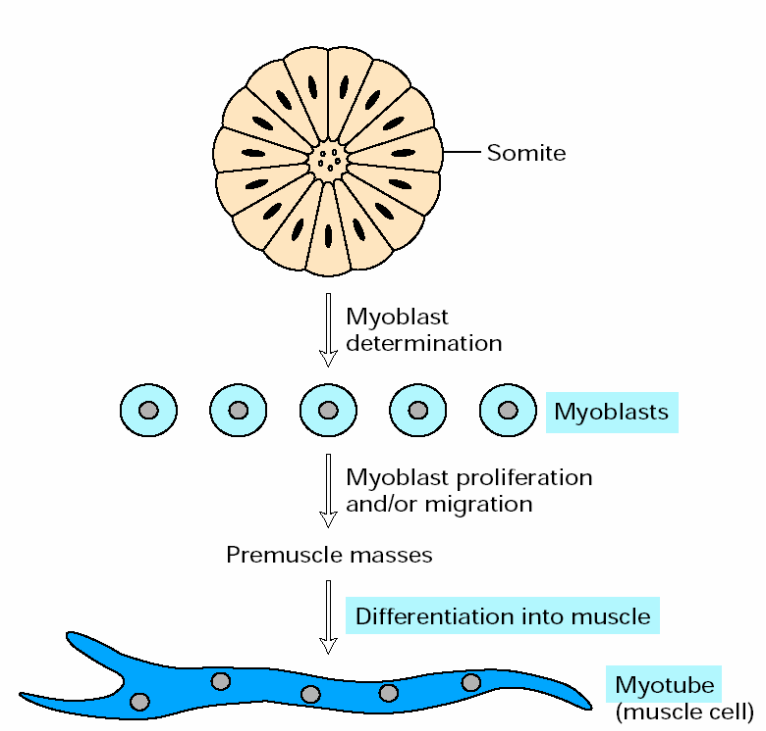


图 14-9 成肌细胞融合成肌管 引自 Harvey Lodish 等 1999

五、细胞结构的变化

（一）染色体结构变化

染色体结构的变化包括基因的删除、扩增、重排和异染色质化等。

1．基因删除

某些原生动物、昆虫及甲壳动物细胞分化过程中就有部分染色体丢失的现象，如马蛔虫的一个变种（2n=4），当个体发育到一定阶段时在将要分化为体细胞的那些细胞中，染色体破裂为碎片，有些含有着丝粒，在细胞分裂中保留，有的不具有着丝粒，而在分裂中丢失，但是将形成生殖细胞的那些细胞中不发生染色体的断裂和丢失现象。再如有些介壳虫的雄性为单倍体，但是与蜜蜂不同的是它们来源于受精卵，将来发育为雄性的胚胎其细胞会排斥父本染色体组，成为单倍体，或者使父本染色体组异固缩化，成为生理上的单倍体。

2．基因扩增

基因扩增是指细胞内某些特定基因的拷贝数专一性地大量增加的现象，如爪蟾的卵母细胞中，rDNA 基因大量扩增以形成大量核糖体，供卵裂和胚胎发育所用，再如果蝇的卵巢滋养细胞和唾腺细胞中，DNA 复制而核不分裂，形成多线染色体。

3．基因重排

基因重排是基因区别表达的一种调控方式。哺乳动物能产生 10^6~10^8 种抗体，

但并不意味着细胞内具有相应数量的基因，免疫球蛋白是异四聚体结构，除重链和轻链的随机组合以外，免疫球蛋白的多样性主要来源于基因的重新组合。

4．DNA 的甲基化与异染色质化

脊椎动物一些基因的活性与基调控区或其周围特定胞嘧啶的甲基化有关，甲基化使基因失活，相应地非甲基化和低甲基化能活化基因的表达。细胞内的基因可分为“管家基因”（house-keeping gene）和“奢侈基因”（luxury gene），前者是维持细胞生存不可缺少的，后者和细胞分化有关，是组织特异性表达的有关基因，在特定组织中保持非甲基化或低甲基化状态，而在其他组织中呈甲基化状态。几乎所有的甲基化均发生在二核苷序列 5'-CG-3'中的 C 上。使胞嘧啶变为 5'-甲基胞嘧啶。而含有这种甲基化 CG 的序列，对应于染色体上的兼性异染色质区域。

DNA 的甲基化修饰不仅出现于分化细胞，双亲的生殖细胞中 DNA 也具有特殊的甲基化，它们以不同方式影响胚胎发育，这就是所谓的双亲印迹（parental imprinting）。例如，从一个刚刚受精的小鼠孕卵移去雄（或雌）原核，并以处于同一发育阶段的另一受精卵的雄（或雌）原核代替，则胚胎发育完全正常；如果一个受精卵的雄性原核被雌性原核代替，含两个雌性原核的合子胚发育正常，但胎盘和卵黄囊发育极差；相反，带有两个雄性原核的合子胚发育出现严重生长阻滞，而胎盘及卵黄囊发育正常。这些实验结果提示，由于所处环境不同，双亲生殖腺中的染色体会被赋予不同的信息特性，这些特性将会影响胚胎发育的某些方面。父本印迹将会选择性地关闭涉及胚胎发育的一些基因，而母本印迹则关闭一些影响胚外结构，如胎盘形成的基因。在人类，某些染色体受母本印迹影响，而另一些则受父本印迹影响，还有一些基因似乎不受双亲印迹的影响。在人胚胎发育异常中所见到葡萄胎（hydatidiform mole）就是父本印迹的典型例子，这种发育异常的特征是原肠胚组织过度发育，然而胚胎部分却极度不发育。这是由于一个卵细胞被两个精子受精，使卵细胞中的母亲基因不能参与发育，或在一个“空”卵中形成重叠的精子原核。当一个新个体产生生殖细胞时，原始印迹即被“抹掉”，依据个体性别，一个新的印迹就会对生殖细胞染色体产生影响。

（二）同工结构的变化

发育过程最普遍的现象之一就是一系列的有序置换，即：在某一特定时期，一种细胞或分子被另一种十分相似、然而又能更好地适应这一阶段优势环境的细胞或分子所取代。在一系列置换过程中，这些连续承袭的单元称为同工型(isoform)。同工型意指分子的，也可以是细胞的、甚至器官水平的同工型。例如在红细胞发育过程中，胚胎期红细胞最初由卵黄囊壁产生并释放入血液，是有核红细胞。以后这种有核红细胞被肝所产生的不同细胞同工型——无核红细胞代替。在红细胞内，血红蛋白分子从胚胎型、胎儿型到成年型的承袭是适应发育过程环境变化及结合、运输氧功能的需要。在组织和器官水平也有很多同工型转换事件，最初长骨由透明软骨组成，以后软骨很快被真正骨组织代替。恒齿置换乳齿也是同工型转变的例子。在胚胎发育过程中，不同类型肾的连续承袭大约是器官水平最复杂的同工型转化事件之一。无论何种肾的同工型，也不管适应何种环境、以何种机制实现功能，这些肾

同工型均保留其排泄废物的基本功能。

第三节 模式动物——果蝇

现在我们可以比较清晰的看到受精卵发育为新个体，是受一系列基因调控的，这些基因在发育过程中，按照时间、空间顺序启动和关闭，互相协调，对胚胎细胞的生长和分化进行调节。细胞分化的实质是在外界信号的作用下，胞内核质相互作用的结果。

根据对果蝇[29]等实验动物的研究，发现在卵细胞中，首先表达的是母体基因，这些基因在在滋养细胞中转录，然后被输入卵细胞，如 bcd、hb、nos、cdl 等基因。这些基因产物在胚形成时，沿前后轴形成一个浓度梯度，决定了胚的前后位置和头尾区域，这些母体基因的产物是一种 DNA 结合蛋白，即转录因子[30]，它激活分节基因的转录（图 14-10）。

Bicoid（bcd）和 Hunchback（hb）决定胚胎前端的形态，bcd 基因失活会引起头胸部缺失，并使头区变为尾节的特征。Nanos（nos）和 Caudal（cdl）等决定后端的形态，Torso（tor）决定胚胎末端的形态，这些基因共同决定胚胎的前后轴。

胚胎的背腹轴由 20 多个基因决定，其中 Dorsal（dl）突变会引起胚胎背部化，胚胎只有背部结构而没有腹部结构，而 cactus（cat）突变会引起胚胎腹部化。

分节基因的功能是把胚胎分为划分为体节，分为三类：间隙基因（gap genes），成对基因（pair-rule genes）和体节极性基因（segment polarity gene）。这三组基因也是等级关系，间隙基因控制成对基因，成对基因控制体节极性基因。

间隙基因。如 kr、kni 等的基因产物将胚分为相当于 3 个体节的区域。间隙基因产物在它们各自的表达区内形成浓度梯度，这些梯度提供位置信息给成对基因。

成对基因的功能是把将间隙基因分成的区域进一步划分为体节，是胚胎分节的前奏。

体节极性基因如 en、wg 被成对基因激活，分别在每个体节的前、后部细胞中表达，以形成和维持体节结构。

体节极性基因又激活同源异形基因（homeotic gene，hox）。决定每一体节的性质与形态特征，即选择体节向某个方向发育、分化，由于这类基因的产物都含有 HD 结构，所以又称为同源异形框（盒）基因（homeobox genes，Hox）。同源异形基因的突变导致发育的异常，如在本来该长触角的地方长出腿来（图 14-11），而在该形成平衡棒的部位长出第二对翅（图 14-12）。

[29]具有易于饲养、生长周期短（10 天完成一代）和特征易于鉴定等特点，是研究遗传和发育生物学的经典材料。

[30] 所谓的转录因子，是能够识别基因的启动子，增强子，并与之结合控制该基因转录的 DNA 结合蛋白，通过对许多转录因子的分析，发现它们都有一个与 DNA 结合的特殊区域：如①螺旋-转角-螺旋（HTH），②锌指结构，③螺旋-环-螺旋（HLH），④同源域结构（DH）主要由 60 个氨基酸序列构成，高度保守，是结合 DNA 的部位，又称为同源盒（homeobox）

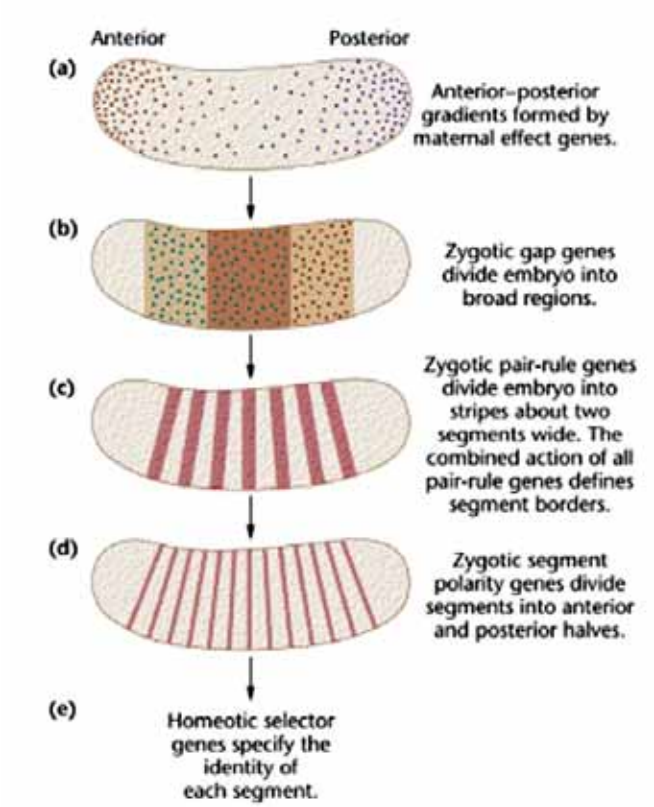


图 14-10 分节基因

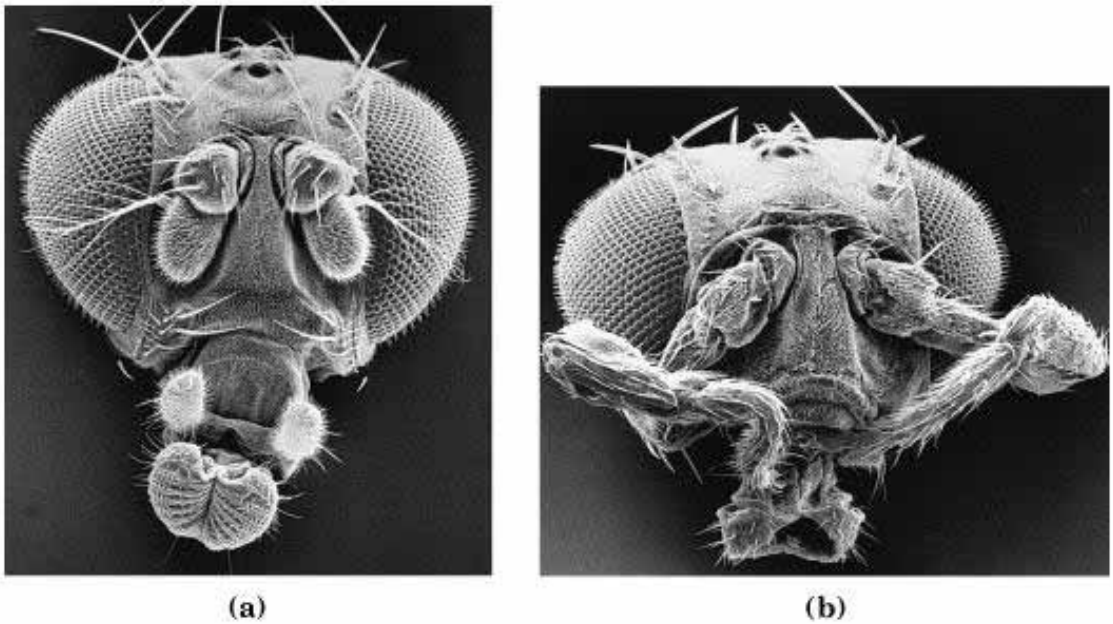


图 14-11 左、正常果蝇的触角为具芒触角，右、突变果蝇的触角发育为足 引自 Lehninger Principles of Biochemistry 3rd ed.

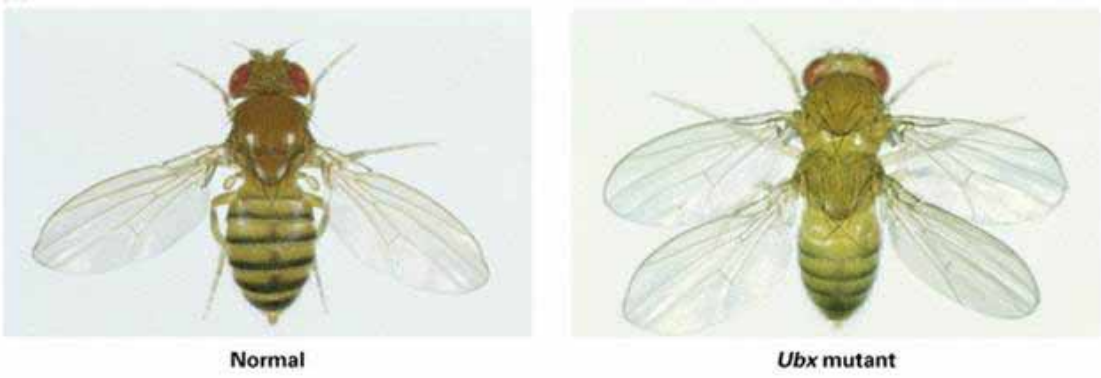


图 14-12 果蝇的双胸突变（两节中胸，没有后胸，因而没有平衡棒）

第四节 细胞的分化潜能

一、全能性、多能性和单能性

受精卵能够分化出各种细胞、组织，形成一个完整的个体，所以把受精卵的分化潜能称为全能性（totipotent）。随着分化发育的进程，细胞逐渐丧失其分化潜能。从全能性到多能性，再到单能性，最后失去分化潜能成为成熟定型的细胞（图 14-13）。

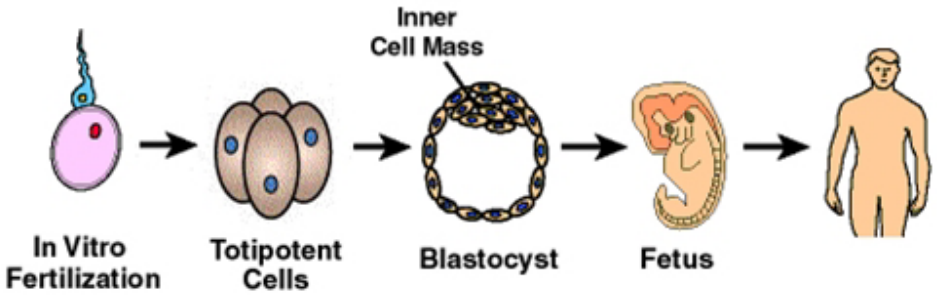


图 14-13 受精卵的全能性

图 15-2 干细胞能分化为多种类型的细胞

植物的枝、叶、根都有可能长成一株完整的植株，细胞培养的结果也证明即使高度分化的植物细胞也可以培养成一个完整的植株（图 14-14），因此可以说绝多数植物细胞具有全能性。

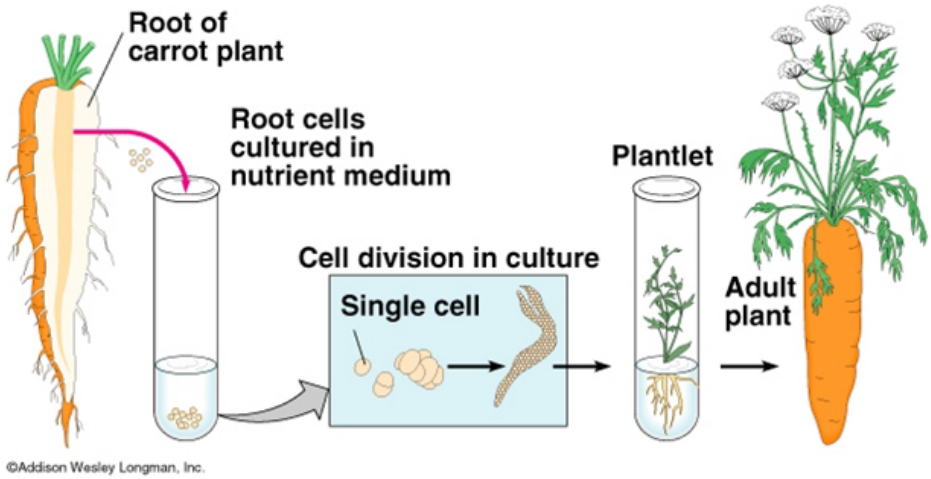


图 14-14 植物细胞的全能性

成熟动物细胞显然不具备全能性。其原因并非在细胞核而在细胞质，如大量的核移殖实验证实，分化细胞的核仍保留完整的基因组 DNA。我国发育生物学家童第周 1978 年成功地将黑斑蛙成熟的细胞核移入去核的受精卵细胞内，培育出了蝌蚪。60 年代的爪蟾和 80 年代小鼠的核移殖，90 年代末多利羊的诞生都证明了分化细胞具有完整的基因组 DNA。

在人的一生中，皮肤、小肠和血液等组织需要不断地更新，这个任务是由干细胞完成的。干细胞是一类具有分裂和分化能力的细胞（图 14-15），多能干细胞可以分化出多种类型的细胞，但它不可能分化出足以构成完整个体的所有细胞，所以多能干细胞的分化潜能称为多能性（pluripotent）。单能干细胞来源于多能干细胞，具有向特定细胞系分化的能力，也称为祖细胞（progenitor）。

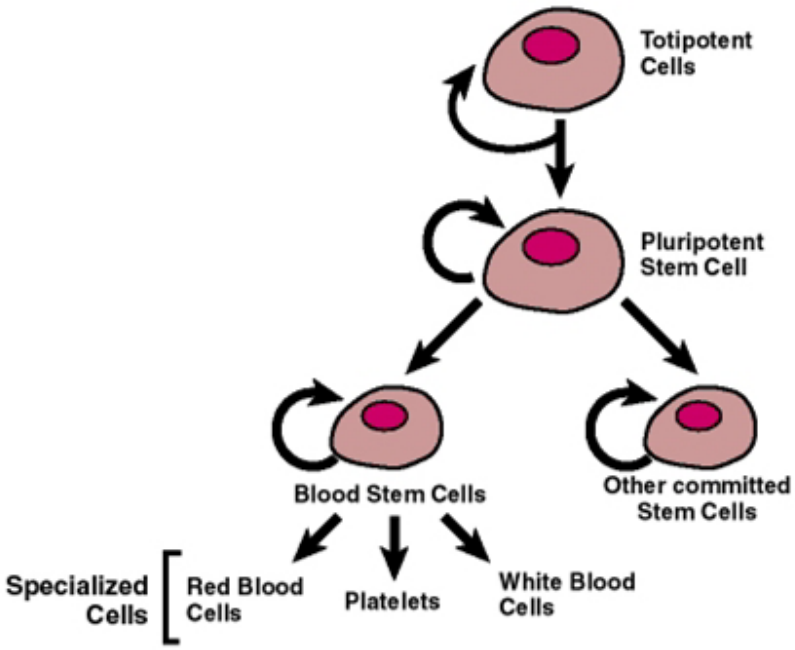


图 14-15 干细胞的分化潜能

二、干细胞的特点

干细胞具有以下生物学特点：①终生保持未分化或低分化特征；②在机体的中的数目、位置相对恒定；③具有自我更新能力；④能无限制的分裂增殖；⑤具有多向分化潜能，能分化成不同类型的组织细胞，造血干细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞等成体干细胞具有一定的跨系、甚至跨胚层分化的潜能；⑥分裂的慢周期性，绝大多数干细胞处于 G_0 期；⑦通过两种方式分裂，对成分裂和不对称分裂，前者形成两个相同的干细胞，后者形成一个干细胞和一个祖细胞。

根据干细胞的分化能力，可以分为全能干细胞、多能干细胞和单能干细胞。全能干细胞可以分化为机体内的任何一种细胞，直至形成一个复杂的有机体。多能干细胞可以分化为多种类型的细胞，如造血干细胞可以分化为 12 种血细胞。

有些文献中将分化潜能更广的细胞叫做多潜能干细胞（pluripotent stem cell），如骨髓间充质干细胞，而把向某一组织类型细胞分化的干细胞叫做多能干细胞（multipotent stem cell），如前面提到的造血干细胞。单能干细胞只能分化为一种类型的细胞，而且自我更新能力有限。

三、胚胎干细胞

根据个体发育过程中出现的先后次序不同，干细胞又可分为胚胎干细胞和成体干细胞。胚胎干细胞（embryonic stem cells，ESC）是指从胚胎内细胞团或原始生殖细胞筛选分离出的具有多能性或全能性的细胞，此外也可以通过体细胞核移植技术获得。ESC能表达POU家族的转录因子Oct-3/4；在移植后能形成的畸胎瘤；在体外适当条件下能分化为代表三胚层结构的体细胞。

ESC的用途主要有：①克隆动物，由体细胞作为核供体进行克隆动物生产，虽然易于取材，但克隆动物个体中表现出严重的生理或免疫缺陷，而且多为致命性的；②转基因动物，以ESC细胞作为载体，可大大加快转基因动物生产的速度，提高成功率；③组织工程，人工诱导ESC定向分化，培育出特定的组织和器官，用于医学治疗的目的。

四、再生

狭义地讲再生指生物的器官损伤后，剩余的部分长出与原来形态功能相同的结构的现象称为再生，如壁虎的尾、蝾螈的肢、螃蟹的足，在失去后又可重新形成，海参可以形成全部内脏，水螅、蚯蚓、蜗虫等低等动物的每一段都可以形成一个完整的个体等等。但是从广义的角度来看再生是生命的普遍现象，从分子、细胞到组织器官都具有再生现象。

再生的形式：

生理性再生：即细胞更新，如人体内每秒中约有 600 万个新生的红细胞替代相同数量死亡的红细胞。

修复性再生：许多无脊椎动物用这种方式来形成失去的器官，如上述提到的壁虎的尾和螃蟹的肢。

重建：是人工实验条件下的特殊现象。如人为将水螅的一片组织分散成单个细胞。在悬液中，这些细胞重新聚集，在几天至几周以后，形成一条新的水螅。

无性繁殖：

关于再生存在着许多引人入胜的问题：

1．机体如何意识到失去的部分，又是如何知道丢失的部位及丢失的多少？即再生如何起始，如何控制？

2．替代物来此何处？是剩余的原胚细胞、干细胞还是已分化的细胞又去分化的结果？

3．原结构的重建是补充的新组织，还是由伤口处一些细胞增殖代替了缺失的结构。

现在普遍认为再生是细胞去分化，细胞迁移和细胞增殖的组合，而不是单纯的补充或增殖。如蝾螈的前肢被切除后，再生包括以下的过程：①伤口处细胞的粘着性减弱，通过变形运动移向伤口。形成单层细胞封闭伤口。这层细胞称为顶帽（apical cap）或顶外胚层帽（apical ectodermal cap）。②顶帽下方的细胞，如骨细胞，软骨细胞，成纤维细胞，肌细胞，神经胶质细胞迅速去分化。形成胚芽。③胚芽内部缺氧，PH 下降，提高了溶酶体的活性，促进受伤组织的清除。④胚芽细胞加快分裂和生长，最后细胞又开始分化构成一个新的肢体。

从蝾螈断肢再生的实验发现，①当臂神经被完全切除时不再发生断肢再生。这是因为神经能产生再生促进因子，其中有一种被鉴定为神经胶质生长因子（glial growth factor，GGF）。②利用视黄酸处理前臂断肢芽基，肢干将忽略已存在的肱骨、桡骨、尺骨，而形成一只从肱骨到指骨的完整手臂。说明视黄酸能干扰正常的位置信息，现在认为位置信息与同源异形基因的表达有关。

第十五章 细胞衰老与死亡

衰老（aging，senescence，senility）又称老化，通常指生物发育成熟后，在正常情况下随着年龄的增加，机能减退，内环境稳定性下降，结构中心组分退行性变化，趋向死亡的不可逆的现象。衰老和死亡是生命的基本现象，衰老过程发生在生物界的整体水平、种群水平、个体水平、细胞水平以及分子水平等不同的层次。生命要不断的更新，种族要不断的繁衍。而这种过程就是在生与死的矛盾中进行的。至少从细胞水平来看，死亡是不可避免的。

第一节 细胞衰老

一、人体细胞的动态分类

人体的自然寿命约120岁，而组成人体组织的细胞寿命有显著差异，根据细胞的增殖能力，分化程度，生存时间，可将人体的组织细胞分为4类：①更新组织：执行某种功能的特化细胞，经过一定时间后衰老死亡，由新细胞分化成熟补充，如上皮细胞、血细胞，构成更新组织的细胞可分为 3 类：a干细胞，能进行增殖又能进入分化过程。b过渡细胞，来自干细胞，是能伴随细胞分裂趋向成熟的中间细胞，c成熟细胞，不再分裂，经过一段时间后衰老和死亡。②稳定组织细胞，是分化程度较高的组织细胞，功能专一，正常情况下没有明显的衰老现象，细胞分裂少见，但在某些细胞受到破坏丧失时，其余细胞也能进行分裂，以补充失去的细胞，如肝、肾细胞。③恒久组织细胞，属高度分化的细胞，个体一生中没有细胞更替，破坏或丧失后不能由这类细胞分裂来补充。如神经细胞，骨骼细胞和心肌细胞。④可耗尽组织细胞，如人类的卵巢实质细胞，在一生中逐渐消耗，而不能得到补充，最后消耗殆尽。

二、细胞衰老的特征

（一）形态变化

衰老细胞的形态变化主要表现在细胞皱缩，膜通透性、脆性增加，核膜内折，细胞器数量特别是线粒体数量减少，胞内出现脂褐素等异常物质沉积，最终出现细胞凋亡或坏死。总体来说老化细胞的各种结构呈退行性变化（表15-1）。

表15-1 衰老细胞的形态变化

核	增大、染色深、核内有包含物
染色质	凝聚、固缩、碎裂、溶解
质膜	粘度增加、流动性降低
细胞质	色素积聚、空泡形成
线粒体	数目减少、体积增大、mtDNA突变或丢失
高尔基体	碎裂
尼氏体	消失
包含物	糖原减少、脂肪积聚
核膜	内陷

（二）分子水平的变化

衰老细胞会出现脂类、蛋白质和 DNA 等细胞成分损伤，细胞代谢能力降低，主要表现在以下方面：

DNA：复制与转录受到抑制，但也有个别基因会异常激活，端粒DNA丢失，线粒体DNA特异性缺失，DNA氧化、断裂、缺失和交联，甲基化程度降低。

RNA：mRNA和tRNA含量降低。

蛋白质：含成下降，细胞内蛋白质发生糖基化、氨甲酰化、脱氨基等修饰反应，导致蛋白质稳定性、抗原性，可消化性下降，自由基使蛋白质肽断裂，交联而变性。氨基酸由左旋变为右旋。

酶分子：活性中心被氧化，金属离子Ca^{2+}、Zn^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{2+}等丢失，酶分子的二级结构，溶解度，等电点发生改变，总的效应是酶失活。

脂类：不饱和脂肪酸被氧化，引起膜脂之间或与脂蛋白之间交联，膜的流动性降低。

三、细胞衰老的机理

关于衰老的机理具有许多不同的学说，概括起来主要有差错学派（Error theories）和遗传学派（Genetic /Programmed theories）两大类，前者强调衰老是由于细胞中的各种错误积累引起的，后者强调衰老是遗传决定的自然演进过程。其实，现在看来两者是相互统一的。

（一）差错学派

细胞衰老是各种细胞成分在受到内外环境的损伤作用后，因缺乏完善的修复，使“差错”积累，导致细胞衰老。根据对导致“差错”的主要因子和主导因子的认识不同，可分为不同的学说，这些学说各有实验证据。

1．代谢废物积累（waste product accumulation）

细胞代谢产物积累至一定量后会危害细胞，引起衰老，哺乳动物脂褐质的沉积是一个典型的例子，脂褐质是一些长寿命的蛋白质和DNA、脂类共价缩合形成的巨交联物，次级溶酶体是形成脂褐质的场所，由于脂褐质结构致密，不能被彻底水解，又不能排出细胞，结果在细胞内沉积增多，阻碍细胞的物质交流和信号传递，最后导致细胞衰老，如老年性痴呆（AD）就是由β-淀粉样蛋白沉积引起的，因此β-AP可做为AD的鉴定指标。

2．大分子交联（cross linking）

过量的大分子交联是衰老的一个主要因素，如 DNA 交联和胶原胶联均可损害其功能，引起衰老。在临床方面胶原交联和动脉硬化、微血管病变有密切关系。

3．自由基学说（free radical theories）

自由基是一类瞬时形成的含不成对电子的原子或功能基团，普遍存在于生物系统。主要包括：氧自由基（如羟自由基·OH）、氢自由基（·H）、碳自由基、脂自由基等，其中·OH的化学性质最活泼。人体内自由基的产生有两方面：一是环境中的高温、辐射、光解、化学物质等引起的外源性自由基；二是体内各种代谢反应产生的内源性自由基。内源性自由基是人体自由基的主要来源，其产生的主要途径有：①由线粒体呼吸链电子泄漏产生；②由经过氧化物酶体的多功能氧化酶（MFO）等催化底物羟化产生。此外，机体血红蛋白、肌红蛋白中还可通过非酶促反应产生自由基。

自由基含有未配对电子，具有高度反应活性，可引发链式自由基反应，引起DNA、蛋白质和脂类，尤其是多不饱和脂肪酸（polyunsaturated fatty Acids，PUFA）等大分子物质变性和交联，损伤DNA、生物膜、重要的结构蛋白和功能蛋白，从而引起衰老各种现象的发生。实验表明DNA中OH^8dG随着年龄的增加而增加。OH^8dG完全失去碱基配对特异性，不仅OH^8dG被错读，与之相邻的胞嘧啶也被错误复制。

正常细胞内存在清除自由基的防御系统，包括酶系统和非酶系统，前者如：超氧化物歧化酶（SOD），过氧化氢酶（CAT），谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-PX），非酶系统有维生素E、醌类物质等电子受体。Orr WC和Sohal RS（1994），将铜锌超氧化物岐化酶（copper-zinc superoxide dismutase）基因导入果蝇，使转基因株具有3个拷贝的SOD基因，其寿命比野生型延长1/3。这个实验为衰老的自由基学说提供了有力的证据。

4．线粒体DNA突变（mitochondrial DNA mutation）

在线粒体氧化磷酸化生成ATP的过程中，大约有1-4%氧转化为氧自由基，也叫活性氧（reactive oxygen species，ROS)，因此线粒体是自由基浓度最高的细胞器。mtDNA裸露于基质，缺乏结合蛋白的保护，最易受自由基伤害，而催化mtDNA复制的DNA聚合酶γ不具有校正功能，复制错误频率高，同时缺乏有效的修复酶，故mtDNA最容易发生突变。mtDNA突变使呼吸链功能受损，进一步引起自由基堆积，如此反复循环。衰老个体细胞中mtDNA缺失表现明显，并随着年龄的增加而增加，许多研究认为mtDNA缺失与衰老及伴随的老年衰退性疾病有密切关系。

人类的脑、心、骨骼肌的氧负荷（oxidative stress）最大，因而是最容易衰老的组织。研究表明，限制热量（caloric restriction）摄入能明显延长小鼠的寿命。

5．体细胞突变与 DNA 修复（somatic mutation and DNA repair）

外源的理化因子，内源的自由基本均可损伤DNA，导致体细胞突变。如辐射可以导致年轻的哺乳动物出现衰老的症状，这与个体正常衰老非常相似。正常机体内存在DNA的修复机制，可使损伤的DNA得到修复，但是随着年龄的增加，这种修复能力下降，导致DNA的错误累积，最终细胞衰老死亡。DNA的修复并不均一，转录活跃基因被优先修复，而在同一基因中转录区被优先修复，而彻底的修复仅发生在细胞分裂的DNA复制时期，这就是干细胞能永保青春的原因。

6．重复基因失活

真核生物基因组DNA重复序列不仅增加基因信息量，而且也是使基因信息免遭机遇性分子损害的一种方式。主要基因的选择性重复是基因组的保护性机制，也可能是决定细胞衰老速度的一个因素，重复基因的一个拷贝受损或选择关闭后，其它拷贝被激活，直到最后一份拷贝用完，细胞因缺少某种重要产物而衰亡。实验证明小鼠肝细胞重复基因的转录灵敏度随年龄而逐渐降低，哺乳动物rRNA基因数随年龄而减少。

（二）遗传学派

认为衰老是遗传决定的自然演进过程，一切细胞均有内在的预定程序决定其寿命，而细胞寿命又决定种属寿命的差异，外部因素只能使细胞寿命在限定范围内变动

1．程序性衰老（programmed senescence）

程序性衰老理论认为，生物的生长、发育、衰老和死亡都由基因程序控制的，衰老实际上是某些基因依次开启或关闭的结果。例如在小鼠肝中，胚胎早期表达的胞质丙氨酸转氨酶（cytosolic alanine aminotransferase，cAAT）为 A 型，随后停止表达，但是在衰老时则表达 B 型 cAAT，其它类似的衰老标志物（senescence markers）也有报道，如肝脏中的衰老标志蛋白 2（senescence marker protein 2）也是在老年期表达。

此外程序性学派还认为衰老还与神经内分泌系统退行性变化以及免疫系统的程序性衰老有关。

2．复制性衰老（replicative senescence）

L.Hayflick （1961）报道，人的成纤维细胞在体外培养时增殖次数是有限的。后来许多实验证明，正常的动物细胞无论是在体内生长还是在体外培养，其分裂次数总存在一个“极极值”。此值被称为“Hayflick”极限，亦称最大分裂次数。如人胚成纤维细胞在体外培养时只能增殖60-70代。

细胞增殖次数与端粒DNA长度有关。Harley等1991发现体细胞染色体的端粒DNA会随细胞分裂次数增加而不断缩短。细胞DNA每复制一次端粒就缩短一段，当缩短到一定程度至Hayflick点时，可能会启动DNA损伤检测点（DNA damage checkpoint），激活p53，引起p21表达（参见第十三章第四节），导致不可逆地退出细胞周期，走向衰亡。资料表明人的成纤维细胞端粒每年缩短14-18bp，可见染色体的端粒有细胞分裂计数器的功能，能记忆细胞分裂的次数。

端粒的长度还与端粒酶（telomerase）的活性有关，端粒酶是一种反转录酶，

能以自身的RNA为模板合成端粒DNA，在精原细胞、干细胞和肿瘤细胞（如Hela细胞）中有较高的端粒酶活性，而正常体细胞中端粒酶的活性很低，呈抑制状态。

3．长寿基因（longevity genes）

统计学资料表明，子女的寿命与双亲的寿命有关，各种动物都有相当恒定的平均寿命和最高寿命，成人早衰症（Werner's syndrome，图15-1）病人平均39岁时出现衰老，47岁左右生命结束，患婴幼儿早衰症（Hutchinson-Gilford syndrome，图15-2）的小孩在1岁时出现明显的衰老，12-18岁即过早夭折。由此来看物种的寿命主要取决于遗传物质，DNA链上可能存在一些“长寿基因”或“衰老基因”来决定个体的寿限。

图15-1 一个37岁的成人早衰症患者 引自http://www.nejm.org on

图15-2 正常儿童（左）和婴幼儿早衰症患者（右）

研究表明当细胞衰老时，一些衰老相关基因（SAG）表达特别活跃，其表达水平大大高于年轻细胞，已在人1号染色体、4号染色体及X染色体上发现SAG。

用线虫的研究表明，基因确可影响衰老及寿限，*Caenorhabditis elegans*的平均寿命仅3.5天，该虫age-1 单基因突变，可提高平均寿命65%，提高最大寿命110%，age-1突变型有较强的抗氧化酶活性，对H_2O_2、农药、紫外线和高温的耐受性均高于野生型。

对早老综合症的研究发现体内解旋酶存在突变，该酶基因位于8号染色体短臂，称为WRN基因。对AD的研究发现，至少与4个基因的突变有关，其中淀粉样蛋白前体基因（APP）的突变，导致基因产物β淀粉蛋白易于在脑组织中沉积，引起AD。

第二节 细胞坏死与凋亡

死亡是生命的普遍现象，但细胞死亡并非与机体死亡同步。正常的组织中，经常发生“正常”的细胞死亡，它是维持组织机能和形态所必需的。细胞死亡的方式通常有 3 种：即①细胞坏死（necrosis）。②细胞凋亡（apoptosis）。③细胞程序性死亡（programmed cell death，PCD）。

一、细胞坏死

是细胞受到化学因素（如强酸、强碱、有毒物质）、物理因素（如热、辐射）和生物因素（如病原体）等环境因素的伤害，引起细胞死亡的现象。坏死细胞的形态改变主要是由下列2种病理过程引起的，即酶性消化和蛋白变性。参与此过程的酶，如来源于死亡细胞本身的溶酶体，则称为细胞自溶（autolysis）；若来源于浸润坏死组织内白细胞溶酶体，则为异溶（heterolysis）。

细胞坏死初期，胞质内线粒体和内质网肿胀、崩解，结构脂滴游离、空泡化，蛋白质颗粒增多，核发生固缩或断裂。随着胞质内蛋白变性、凝固或碎裂，以及嗜碱性核蛋白的降解，细胞质呈现强嗜酸性，故坏死组织或细胞在苏木精/伊红染色切片中，胞质呈均一的深伊红色，原有的微细结构消失。在含水量高的细胞，可因胞质内水泡不断增大，并发生溶解，导致细胞结构完全消失，最后细胞膜和细胞器破裂，DNA降解，细胞内容物流出，引起周围组织炎症反应（图15-3）。

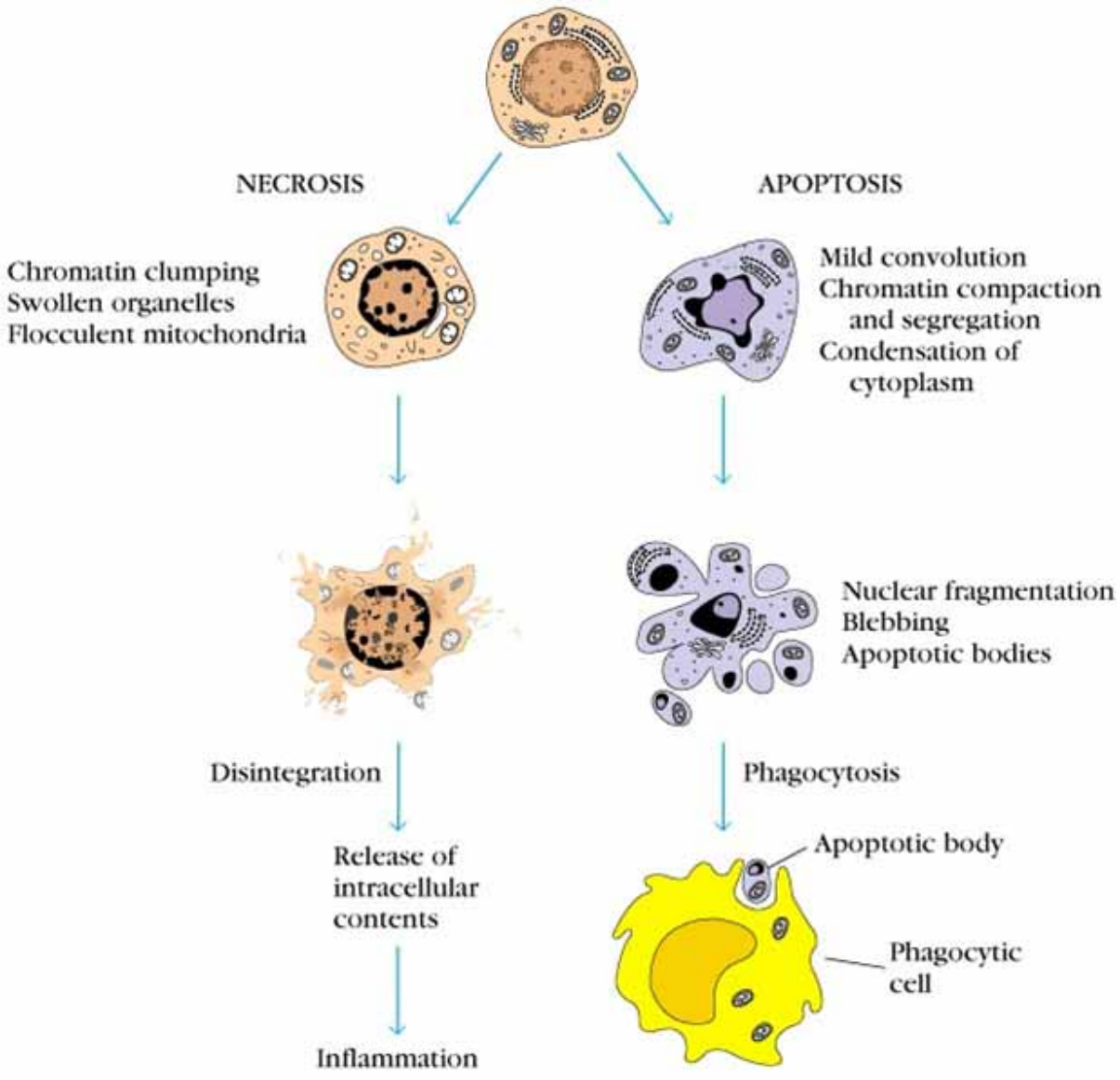


图15-3 细胞坏死与凋亡的形态区别

二、细胞凋亡

细胞凋亡（cell apoptosis）是借用古希腊语，表时细胞象秋天的树叶一样凋落的死亡方式。1972年Kerr最先提出这一概念，他发现结扎大鼠肝的左，中叶门静脉后，其周围细胞发生缺血性坏死，但由肝动脉供应区的实质细胞仍存活，只是范围逐渐缩小，其间一些细胞不断转变成细胞质小块，不伴有炎症，后在正常鼠肝中也偶然见到这一现象。

凋亡细胞的主要特征是（参见表15-2）：①染色质聚集、分块、位于核膜上，胞质凝缩，最后核断裂，细胞通过出芽的方式形成许多凋亡小体（图15-4）；②凋亡

小体内有结构完整的细胞器，还有凝缩的染色体，可被邻近细胞吞噬消化，因始终有膜封闭，没有内溶物释放，故不会引起炎症；③凋亡细胞中仍需要合成一些蛋白质，但是在坏死细胞中ATP和蛋白质合成受阻或终止；④核酸内切酶活化，导致染色质DNA在核小体连接部位断裂，形成约200bp整数倍的核酸片段，凝胶电泳图谱呈梯状；⑤凋亡通常是生理性变化，而细胞坏死是病理性变化。

表15-2 细胞凋亡和细胞坏死的区别

区别点	细胞凋亡	细胞坏死
起因	生理或病理性	病理性变化或剧烈损伤
范围	单个散在细胞	大片组织或成群细胞
细胞膜	保持完整，一直到形成凋亡小体	破损
染色质	凝聚在核膜下呈半月状	呈絮状
细胞器	无明显变化	肿胀、内质网崩解
细胞体积	固缩变小	肿胀变大
凋亡小体	有，被邻近细胞或巨噬细胞吞噬	无，细胞自溶，残余碎片被巨噬细胞吞噬
基因组 DNA	有控降解，电泳图谱呈梯状	随机降解，电泳图谱呈涂抹状
蛋白质合成	有	无
调节过程	受基因调控	被动进行
炎症反应	无，不释放细胞内容物	有，释放内容物。

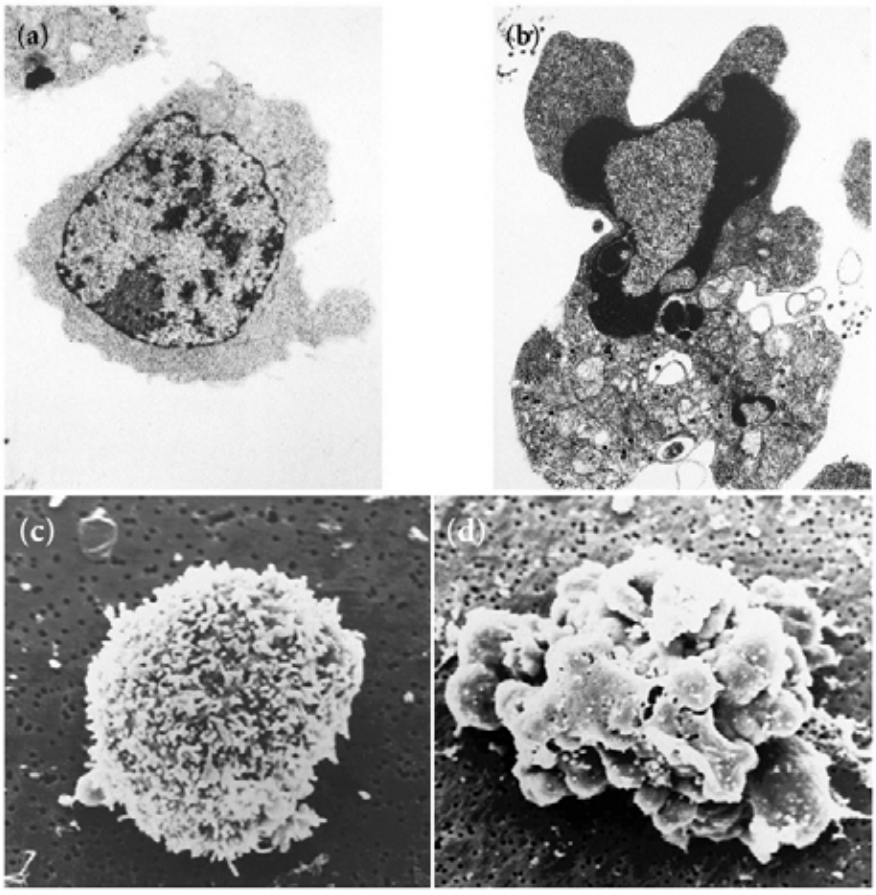


图15-4 左，正常胸腺细胞；右，凋亡胸腺细胞（注意凋亡小体）

在细胞凋亡一词出现之前，胚胎学家已观察到动物发育过程中存在着细胞程序性死亡（programmed cell death，PCD）现象，它是胚胎正常发育所必需的。近年来PCD和细胞凋亡常被做为同义词使用，但两者实质上是有差异的。首先，PCD是一个功能性概念，描述在一个多细胞生物体中，某些细胞的死亡是个体发育中一个预定的，并受到严格控制的正常组成部分，而凋亡是一个形态学概念，指与细胞坏死不同的受到基因控制的细胞死亡形式；其次，PCD的最终结果是细胞凋亡，但细胞凋亡并非都是程序化的。

线虫*Caenorhabditis elegans*是研究个体发育和细胞程序性死亡的理想材料。其生命周期短，细胞数量少，成熟的成虫若是雌雄同体则有959个体细胞，约2000个生殖细胞。若是雄虫则有1031个体细胞和约1000个生殖细胞。神经系统由302个细胞组成，这些细胞来自于407个前体细胞，这些前体细胞中有105个发生了程序死亡。

麻省理工学院的Robert Horvitz领导的研究小组采用体细胞突变的方法发现共有14个基因在*C. elegans*细胞凋亡中起作用，其中在细胞凋亡的实施阶段起作用的主要有3个：Ced-3、Ced-4和Ced-9，其中Ced-3和Ced-4的作用是诱发凋亡，在缺乏Ced-3、Ced-4的突变体中不发生凋亡，有多余细胞存在。Ced-9抑制Ced-3、Ced-4的作用，使凋亡不能发生，Ced-9功能不足导致胚胎因细胞过度凋亡而死亡。

2002年10月7日英国人悉尼·布雷诺尔、美国人罗伯特·霍维茨和英国人约翰·苏尔斯顿，因在器官发育的遗传调控和细胞程序性死亡方面的研究，获诺贝尔生理与医学奖（图15-5）。

图15-5 2002年诺贝尔生理与医学奖获得者（图片来自http://www.nobel.se/）

第三节 细胞凋亡的分子机理

细胞凋亡和细胞增殖都是生命的基本现象，是维持体内细胞数量动态平衡的基本措施。在胚胎发育阶段通过细胞凋亡清除多余的和已完成使命的细胞，保证了胚胎的正常发育；在成年阶段通过细胞凋亡清除衰老和病变的细胞，保证了机体的健康。和细胞增殖一样细胞凋亡也是受基因调控的精确过程，在这一节我们就细胞凋亡的分子机理作简要的介绍。

细胞凋亡的途径主要有两条，一条是通过胞外信号激活细胞内的凋亡酶

caspase、一条是通过线粒体释放凋亡酶激活因子激活 caspase。这些活化的可将细胞内的重要蛋白降解，引起细胞凋亡。

一、凋亡相关的基因和蛋白

细胞凋亡的调控涉及许多基因，包括一些与细胞增殖有关的原癌基因和抑癌基因。其中研究较多的有 ICE、Apaf-1、Bcl-2、Fas/APO-1、c-myc、p53、ATM 等。

1．Caspase 家族

Caspase属于半胱氨酸蛋白酶，相当于线虫中的ced-3，这些蛋白酶是引起细胞凋亡的关键酶，一旦被信号途径激活，能将细胞内的蛋白质降解，使细胞不可逆的走向死亡。它们均有以下特点：①酶活性依赖于半胱氨酸残基的亲核性；②总是在天冬氨酸之后切断底物，所以命名为caspase（cysteine aspartate-specific protease），方便起见本文称之为凋亡酶；③都是由两大、两小亚基组成的异四聚体，大、小亚基由同一基因编码，前体被切割后产生两个活性亚基。

最早发现人类中与线虫ced-3同源的基因[31]是ICE，即：白介素-1 β转换酶（Interleukin-1 β-converting enzyme）基因，因该酶能将白介素前体切割为活性分子，故名。通过cDNA杂交和查找基因组数据库，在人类细胞中已发现11个ICE同源物[32]，分为2个亚族（subgroup）：ICE亚族和CED-3家族（图15-6），前者参与炎症反应，后者参与细胞凋亡，又分为两类：一类为执行者（executioner或effector），如caspase-3、6、7，它们可直接降解胞内的结构蛋白和功能蛋白，引起凋亡，但不能通过自催化（autocatalytic）或自剪接的方式激活；另一类为启动者（initiator），如caspase-8、9，受到信号后，能通过自剪接而激活，然后引起caspase级联反应，如caspase-8可依次激活caspase-3、6、7。

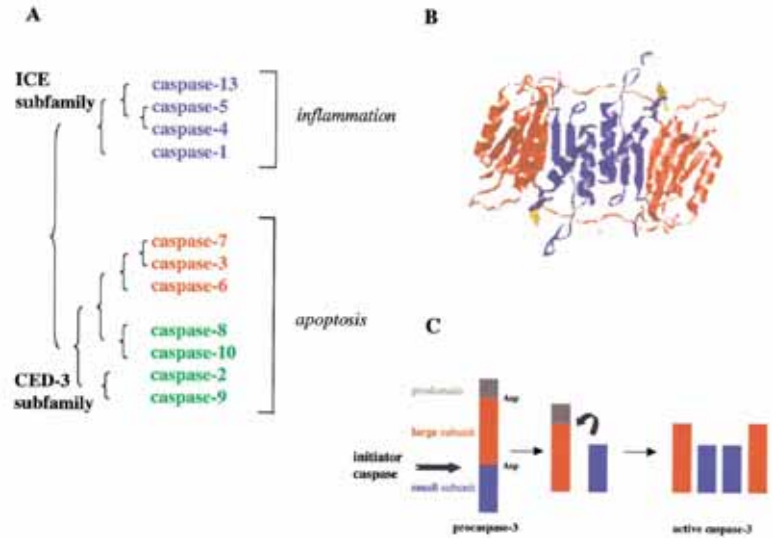


图15-6：ICE家族成员 A：3类caspase：蓝色参与炎症反应，红色为执行者，绿色为启动者；B：caspase-3的结构模型；C：caspase-3的活化过程 引自Katja C. Zimmermann等2001

[31]Horvitz 实验室的袁均英 1993 年发现哺乳动物 ced-3 的同源物为白介素-1-β 转换酶（ICE）。

[32] 哺乳动物中已发现 14 个。

细胞中还具有 caspase 的抑制因子，称为 IAPs（inhibitors of apoptosis proteins），属于一个庞大的蛋白家族。它们能通过 BIR 结构域（baculovirus IAP repeats domain）[33]与 caspase 结合，抑制其活性，如 XIAP。

2．Apaf-1

Apaf-1 被称为凋亡酶激活因子-1（apoptotic protease activating factor-1），在线虫中的同源物为 ced-4，在线粒体参与的凋亡途径中具有重要作用，该基因敲除后，小鼠神经细胞过多，脑畸形发育。Apaf-1 含有 3 个不同的结构域：①CARD（caspase recruitment domain）结构域，能召集 caspase-9；②ced-4 同源结构域，能结合 ATP/dATP；③C 端结构域，含有色氨酸/天冬氨酸重复序列，当细胞色素 c[34]的结合到这一区域后，能引起 Apaf-1 多聚化而激活。Apaf-1 具有激活 Caspase-3 的作用，而这一过程又需要细胞色素 c（Apaf-2）和 caspase-9（Apaf-3）参与。Apaf-1/细胞色素 c 复合体与 ATP/dATP 结合后，Apaf-1 就可以通过其 CARD 结构域召集 caspase-9，形成凋亡体（apoptosome），激活 caspase-3，启动 caspase 级联反应。

3．Bcl-2 家族

Bcl-2[35]为凋亡抑制基因，是膜的整合蛋白，其功能相当于线虫中的 ced-9。现已发现至少 19 个同源物，它们在线粒体参与的凋亡途径中起调控作用，能控制线粒体中细胞色素 c 等凋亡因子的释放。

Bcl-2 家族成员都含有 1-4 个 Bcl-2 同源结构域（BH1-4），并且通常有一个羧端跨膜结构域(transmembrane region ,TM)。其中 BH4 是抗凋亡蛋白所特有的结构域，BH3 是与促进凋亡有关的结构域。根据功能和结构可将 Bcl-2 基因家族分为两类（图 15-7），一类是抗凋亡的（anti-apoptotic），如：Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w、Mcl-1；一类是促进凋亡的（pro-apoptotic），如：Bax、Bak、Bad、Bid、Bim，在促凋亡蛋白中还有一类仅含 BH3 结构，如 Bid、Bad。

虽然 Bcl-2 蛋白存在于线粒体膜、内质网膜以及外核膜上，但主要定位于线粒体外膜，它拮抗促凋亡蛋白的功能。而大多数促凋亡蛋白则主要定位于细胞质，一旦细胞受到凋亡因子的诱导，它们可以向线粒体转位，通过寡聚化在线粒体外膜形成跨膜通道，或者开启线粒体的 PT 孔，从而导致线粒体中的凋亡因子释放，激活 caspase，导致细胞凋亡。

胞质中的促凋亡蛋白可通过不同的方式被激活，包括去磷酸化，如 Bad；被 caspase 加工为活性分子，如 Bid；从结合蛋白上释放出来，如 Bim 是与微管蛋白结合在一起的。

---

[33] 最早在细菌和病毒中发现。

[34] 是线粒体内膜的外周蛋白，呼吸链中的两个可移动组分之一，位于膜间隙，释放到细胞质中会引起细胞凋亡。

[35] 是一种原癌基因，名称来源于 B 细胞淋巴瘤/白血病-2（B-cell lymphoma/Leukemia-2，bcl-2），最早由 Tsujimoto（1985）从伴有 14、18 染色体易位的淋巴瘤细胞中发现，在正常人体内位于 18 号染色体，在患者易位于 14 号染色体。

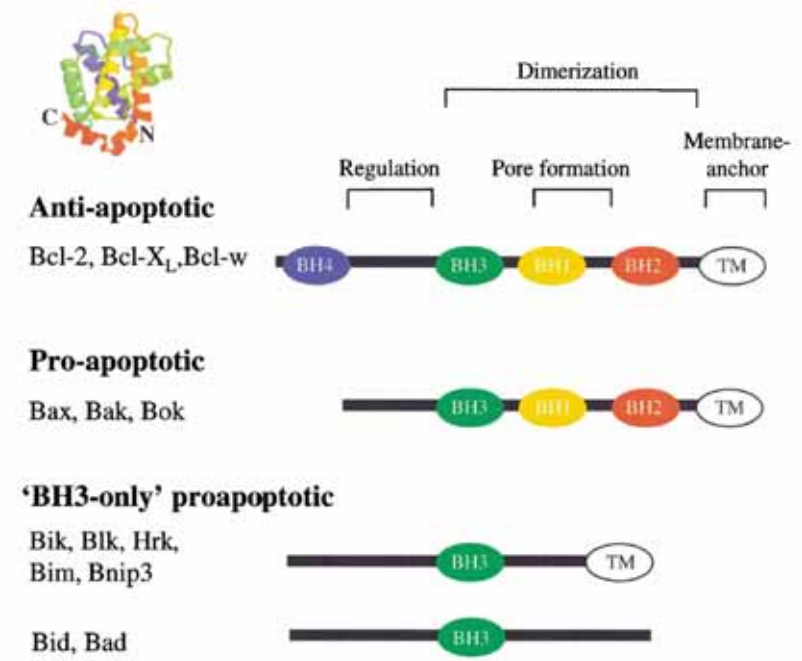


图 15-7 Bcl-2 家族 引自 Katja C. Zimmermann 等 2001

4．Fas

Fas 又称作 APO-1/CD95，属 TNF 受体家族。Fas 基因编码产物为分子量 45KD 的跨膜蛋白，分布于胸腺细胞，激活的 T 和 B 淋巴细胞，巨噬细胞，肝、脾、肺、心、脑、肠、睾丸和卵巢细胞等。Fas 蛋白与 Fas 配体结合后，会激活 caspase，导致靶细胞走向凋亡。

5．p53

是一种抑癌基因，其生物学功能是在 G 期监视 DNA 的完整性。如有损伤，则抑制细胞增殖，直到 DNA 修复完成。如果 DNA 不能被修复，则诱导其调亡，研究发现丧失 p53 功能的小鼠胸腺细胞对糖皮质激素诱导的调亡反应和正常细胞相同，而对辐射诱导的调亡不敏感。

6．myc

在许多人类恶性肿瘤细胞中都发现有 c-myc 的过度表达，它能促进细胞增殖、抑制分化。在凋亡细胞中 c-myc 也是高表达，作为转录调控因子，一方面它能激活那些控制细胞增殖的基因，另一方面也激活促进细胞凋亡的基因，给细胞两种选择：增殖或凋亡。当生长因子存在，Bcl-2 基因表达时，促进细胞增殖，反之细胞凋亡。

7.ATM

ATM（ataxia telangiectasia-mutated gene）是与 DNA 损伤检验有关的一个重要基因。最早发现于毛细血管扩张性共济失调症患者，人类中大约有 1%的人是 ATM 缺失的杂合子，表现出对电离辐射敏感和易患癌症。正常细胞经放射处理后，DNA 损伤会激活修复机制，如 DNA 不能修复则诱导细胞凋亡。ATM 是 DNA 损伤检验点的一个重要的蛋白激酶（参见第十三章第四节）

二、Fas 介导的细胞凋亡

细胞表面的凋亡受体是属于肿瘤坏死因子受体（TNFR）家族的跨膜蛋白，它们包括 Fas（Apo-1/CD95）、TNFR1、DR3/WSL、DR4/TRAIL-R1 和 DR5/TRAIL-R2。其配体属于 TNF 家族，目前已比较清楚的是 Fas 介导的细胞凋亡途径。

Fas 具有三个富含半胱氨酸的胞外区和一个称为死亡结构域（Death domain，DD，图 15-8）的胞内区。Fas 的配体 FasL（Fas ligand）与 Fas 结合后，Fas 三聚化使胞内的 DD 区构象改变，然后与接头蛋白 FADD（Fasassociated death domain）的 DD 区结合，而后 FADD 的 N 端 DED 区（death effector domain）就能与 Caspase-8（或-10）前体蛋白结合，形成 DISC (death-inducing signaling complex)[36] ，引起 caspase-8、10 通过自身剪激活，它们启动 caspase 的级联反应，使 caspase-3、-6、-7 激活，这几种 Caspase 可降解胞内结构蛋白和功能蛋白，最终导致细胞凋亡。

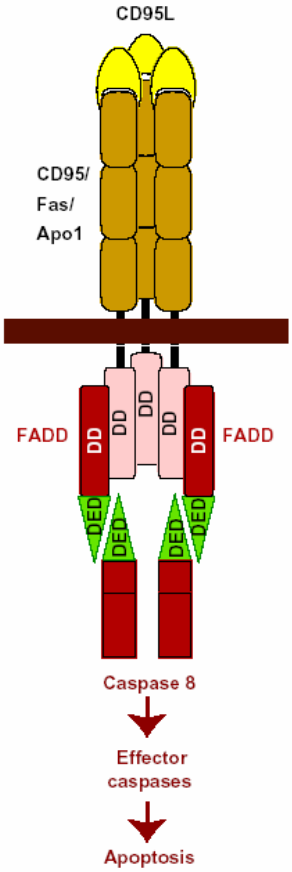


图 15-8 FAS 介导的细胞凋亡 引自 Avi Ashkenazi and Vishva M. Dixit 1998

[36] Kischkel 等 1995 发现 Fas 活化时可以与至少 4 种蛋白相连，分别称为 CAP1(Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins 1)、CAP2、CAP3 和 CAP4，这 4 种蛋白与活化的 Fas 受体一起被称为死亡诱导信号复合物(death-inducing signaling complex, DISC)。随后的研究证实 CAP1 和 CAP2 是不同形式丝氨酸磷酸化的 FADD 蛋白，CAP3 和 CAP4 实际上就是活化的 caspase-8。

Caspase 可激活名叫 CAD（caspase-activated Dnase）的核酸酶，CAD 能在核小体的连接区将其切断，形成约为 200bp 整数倍的核酸片段。正常情况下 CAD 存在于胞质中，并且与抑制因子 ICAD/DFF-45 蛋白结合，不能进入细胞核。Caspase 活化后可以降解 ICAD/DFF-45，释放出 CAD，使它进入细胞核降解 DNA。

Fas/FasL 系统在免疫系统中具有重要的作用，其一是参与免疫调节，活化成熟的外周 T 细胞主要通过 Fas/FasL 系统介导的细胞凋亡清除与自身抗原有交叉反应的克隆和由自身抗原激活的细胞克隆，以限制 T 细胞克隆的无限增殖，防止对自身组织的损伤，即产生外周免疫耐受。淋巴细胞凋亡异常导致的免疫耐受失控，是自身免疫性疾病的主要病因。其二是细胞毒 T 细胞（CTL）可以通过 FasL 诱导靶细胞凋亡，但遗憾的是，某些肿瘤细胞也可以通过这一途径诱导淋巴细胞凋亡，从而逃脱免疫监控。

三、线粒体与细胞凋亡

细胞应激反应或凋亡信号能引起线粒体细胞色素 c 释放，作为凋亡诱导因子，细胞色素 c 能与 Apaf-1、caspase-9 前体、ATP/dATP 形成凋亡体（apoptosome，图 15-9），然后召集并激活 caspase-3，进而引发 caspases 级联反应，导致细胞凋亡。

在这里，一个核心的问题是细胞色素 c 究竟通过哪一种途径释放到细胞质中，由于大部分凋亡细胞中很少发生线粒体肿胀和线粒体外膜破裂的现象，所以目前普遍认为细胞色素是通过线粒体 PT 孔或 Bcl-2 家族成员形成的线粒体跨膜通道释放到细胞质中的。

线粒体 PT 孔（permeability transition pore）主要由位于内膜的腺苷转位因子（Adenine nucleotide translocator，ANT）和位于外膜的电压依赖性阴离子通道（Voltage dependent anion channel，VDAC）等蛋白所组成，PT 孔开放会引起线粒体跨膜电位下降和细胞色素 c 释放。Bcl-2 家族蛋白对于 PT 孔的开放和关闭起关键的调节作用，促凋亡蛋白 Bax 等可以通过与 ANT 或 VDAC 的结合介导 PT 孔的开放，而抗凋亡类蛋白如 Bcl-2、Bcl-xL 等则可通过与 Bax 竞争性地与 ANT 结合，或者直接阻止 Bax 与 ANT、VDAC 的结合来发挥其抗凋亡效应。

Bcl-2 家族的结构和能形成离子通道的一些毒素（如大肠杆菌毒素）非常相似。插入膜结构中形成较大的通道，允许细胞色素 c 等蛋白质通过，这可能是细胞色素 c 释放的另一个途径。

在线虫中 ced-3 和 ced-4 的缺失突变抑制所有发育阶段的细胞死亡。在哺乳动物中，尽管 Apaf-1 基因缺失的小鼠没有 caspase 活化，但除了神经细胞过多外，大多数器官发育是正常的。近年来的研究发现随细胞色素 c 释放的蛋白还有 Smac（second mitochondria-derived activator of caspase）、凋亡诱导因子（apoptosis inducing factor，AIF）和核酸内切酶 G(Endo G)。Smac 能通过 N 端的几个氨基酸与 IAPs（凋亡抑制蛋白）的 BIR 结构域结合，从而解除 IAP 对 caspase 的抑制；AIF[37]则引起核固缩和染色质断裂；Endo G 可以使 DNA 片段化。可见即使在 caspase

[37]是一种依赖于黄素的一种氧化还原酶，目前还不清楚其作用机制。

不参与的情况下，由线粒体途径仍可引起细胞凋亡。

在对 Fas 应答的细胞中，一型细胞（type I），如胸腺细胞，其 caspase-8 有足够的活性，被 Fas 活化后导致细胞凋亡，在这类细胞中高表达 Bcl-2 不能抑制 Fas 诱导的细胞凋亡。在二型细胞（type II），如肝细胞中，Fas 介导的 caspase-8 活化不能达到足够的水平，因此这类细胞中的凋亡信号需要借助凋亡的线粒体途径来放大。活化的 caspase-8 将胞质中的 Bid 剪切，形成活性分子 tBid（truncated Bid），tBid 进入线粒体，导致细胞色素 c 释放，使凋亡信号放大。

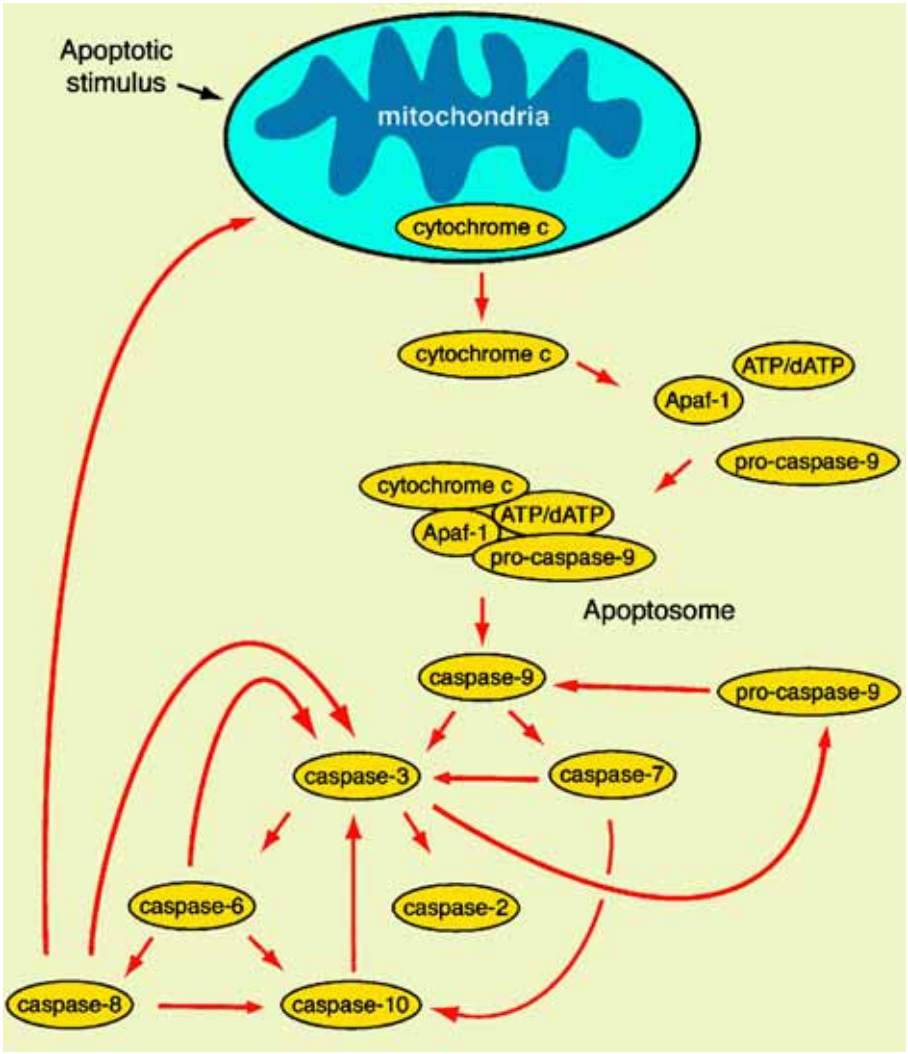


图 15-9 细胞色素释放引起的凋亡 引自 R. Chris Bleackley and Jeffrey A. Heibein 2001

我们不难看出线粒体既是细胞的能量工厂，也是细胞的凋亡控制中心，可是为什么线粒体会担负起如此重要的双重功能呢？一个主要的原因是各类生长因子都可以促进葡萄糖转运和己糖激酶等向线粒体转运、加速能量生产，相反地剥夺生长因子后，细胞氧消耗降低、ATP 合成不足、蛋白质合成受阻，最后细胞走向死亡。由于这一方面的资料较少，目前还很难作出一个较好的解释，只能留在以后再完善。

第十六章 肿瘤细胞

肿瘤（tumor，neoplasm）是一种基因病，但并非是遗传的；它是指细胞在致瘤因素作用下，基因发生了改变，失去对其生长的正常调控，导致异常增生。可分为良性和恶性肿瘤两大类。前者生长缓慢，与周围组织界限清楚，不发生转移，对人体健康危害不大。后者生长迅速，可转移到身体其它部位，还会产生有害物质，破坏正常器官结构，使机体功能失调，威胁生命。

恶性肿瘤也叫癌症（cancer）是目前危害人类健康最严重的一类疾病。在美国，恶性肿瘤的死亡率仅次于心血管疾病而居第二位。据我国2000年卫生事业发展情况统计公报，城市地区居民死因第一位为恶性肿瘤，其次为脑血管病、心脏病。我国最为常见和危害性严重的肿瘤为肺癌、鼻咽癌、食管癌、胃癌、大肠癌、肝癌、乳腺癌、宫颈癌、白血病及淋巴瘤等。

肿瘤组织由实质和间质两部分构成，肿瘤实质是肿瘤细胞，是肿瘤的主要成分，具有组织来源特异性。肿瘤的间质起支持和营养肿瘤实质的作用，不具特异性，一般由结缔组织和血管组成，有时还可有淋巴管。

第一节 癌细胞的主要特征

癌细胞有三个显著的基本特征即：不死性，迁移性和失去接触抑制。除此之外，癌细胞还有许多不同于正常细胞的生理、生化和形态特征。

一、癌细胞的形态特征

癌细胞大小形态不一，通常比它的源细胞体积要大，核质比显著高于正常细胞，可达 1:1，正常的分化细胞和之比仅为 1:4-6。

核形态不一，并可出现巨核、双核或多核现象。核内染色体呈非整倍态（aneuploidy），某些染色体缺失，而有些染色体数目增加。正常细胞染色体的不正常变化，会启动细胞凋亡过程，但是癌细胞中，细胞凋亡相关的信号通路产生障碍，也就是说癌细胞具有不死性。

线粒体表现为不同的多型性、肿胀、增生，如嗜酸性细胞腺瘤中肥大的线粒体紧挤在细胞内，肝癌细胞中出现巨线粒体。

细胞骨架紊乱，某些成分减少，骨架组装不正常。细胞表面特征改变，产生肿瘤相关抗体（tumor associated antigen）。

二、癌细胞的生理特征

细胞周期失控，就像寄生在细胞内的微生物，不受正常生长调控系统的控制，

能持续的分裂与增殖。

具有迁移性，细胞粘着和连接相关的成分（如ECM、CAM）发生变异或缺失，相关信号通路受阻，细胞失去与细胞间和细胞外基质间的联结，易于从肿瘤上脱落。许多癌细胞具有变形运动能力，并且能产生酶类，使血管基底层和结缔组织穿孔，使它向其它组织迁移（图16-1）。

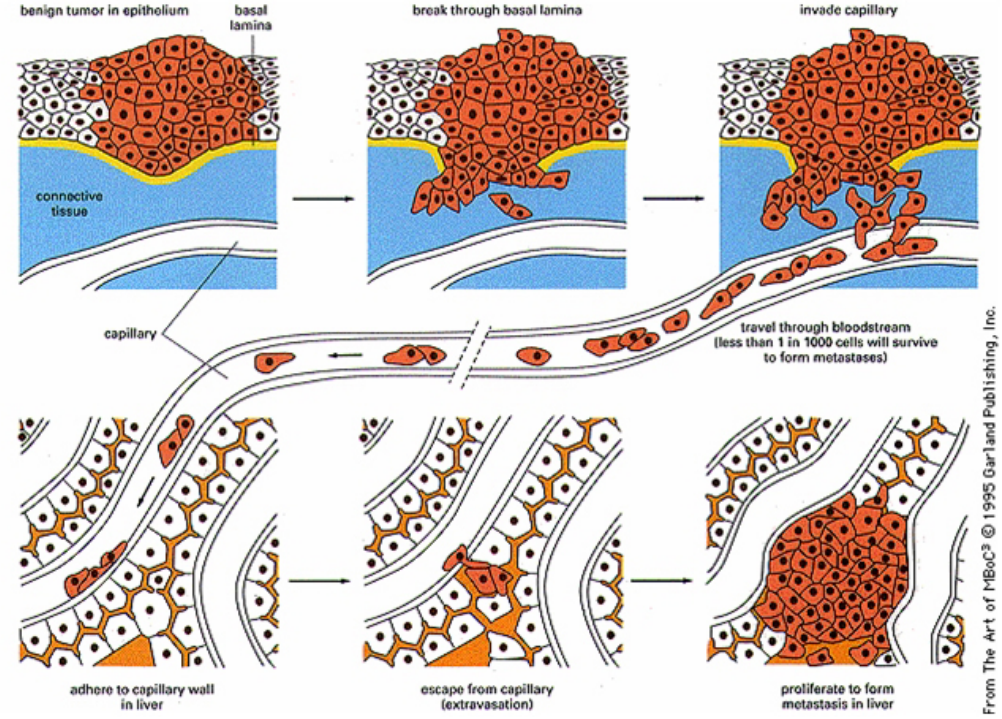


图 16-1 肿瘤的迁移

接触抑制丧失，正常细胞在体外培养时表现为贴壁生长和汇合成单层后停止生长的特点，即接触抑制现象，而肿瘤细胞即使堆积成群，仍然可以生长（图 16-2）。

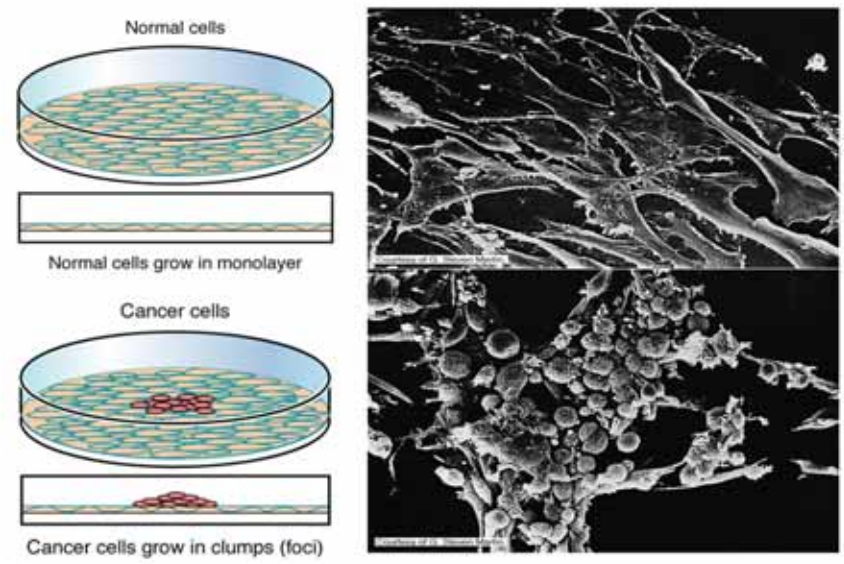


图 16-2 肿瘤细胞失去接触抑制现象

定着依赖性丧失，正常真核细胞，除成熟血细胞外，大多须粘附于特定的细胞外基质上才能抑制凋亡而存活，称为定着依赖性（anchorage dependence）。肿瘤细胞失去定着依赖性，可以在琼脂、甲基纤维素等支撑物上生长。

去分化现象，已知肿瘤细胞中表达的胎儿同功酶达 20 余种。胎儿甲种球蛋白（甲胎蛋白）是胎儿所特有的。但在肝癌细胞中表达，因此可做肝癌早期检定的标志特征。

对生长因子需要量降低，体外培养的癌细胞对生长因子的需要量显著低于正常细胞，是因为自分泌或其细胞增殖的信号途径不依赖于生长因素。某些固体瘤细胞还能释放血管生成因子，促进血管向肿瘤生长。获取大量繁殖所需的营养物质。

代谢旺盛，肿瘤组织的DNA和RNA聚合酶活性均高于正常组织，核酸分解过程明显降低，DNA和RNA的含量均明显增高。

蛋白质合成及分解代谢都增强，但合成代谢超过分解代谢，甚至可夺取正常组织的蛋白质分解产物，结果可使机体处于严重消耗的恶病质（cachexia）状态。

线粒体功能障碍，即使在氧供应充分的条件下也主要是糖酵解途径获取能量。与三个糖酵解关键酶（己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶）活性增加和同工酶谱的改变，以及糖原异生关键酶活性降低有关。

可移植性，正常细胞移植到宿主体内后，由于免疫反应而被排斥，多不易存活。但是肿瘤细胞具有可移植性，如人的肿瘤细胞可移植到鼠类体内，形成移植瘤。

第二节 肿瘤形成

肿瘤形成(oncogenesis)的过程包括始发突变、潜伏、促癌和演进。始发突变是指细胞在致癌物的作用下发生了基因突变，但是突变发生后如果没有适当的环境不会发展为肿瘤，此阶段称为潜伏期；促癌是指在促癌剂（刺激细胞增长的因子，如激素）作用下开始增殖的过程，促癌因子的作用是可逆的，如果去除，引起扩增的克隆就会消失；演进是指肿瘤在生长过程中越来越变得具有侵袭力的过程，是不可逆的。肿瘤形成往往涉及许多基因的突变，需要十到数十年的时间，因而恶性肿瘤通常属于老年性疾病。。

一、肿瘤形成的内因

恶性肿瘤的形成往往涉及多个基因的改变，与原癌基因、抑癌基因突变的逐渐积累有关。

（一）原癌基因

原癌基因（oncogene）是细胞内与细胞增殖相关的基因，是维持机体正常生命活动所必须的，在进化上高等保守。当原癌基因的结构或调控区发生变异，基因产

物增多或活性增强时，使细胞过度增殖，从而形成肿瘤。

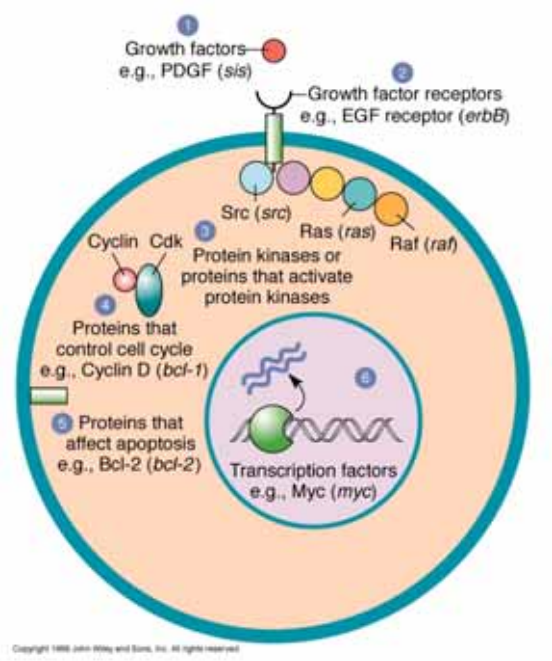


图16-3 原癌基因的产物 引自

原癌基因的产物主要包括（图16-3）：①生长因子，如sis，②生长因子受体，如fms、erbB，③蛋白激酶及其它信号转导组分，如src、ras、raf，④细胞周期蛋白，如bcl-1，⑤细胞凋亡调控因子，如bcl-2，⑥转录因子，如myc、fos、jun。

表16-1 一些原癌基因的功能

原癌基因	功能	相关肿瘤
sis	生长因子	Erwing 网瘤
erb-B	受体酪氨酸激酶，EGF 受体	星形细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胃癌、唾腺癌
fms	受体酪氨酸激酶，CSF-1 受体	髓性白血病
ras	G-蛋白	肺癌、结肠癌、膀胱癌、直肠癌
src	非受体酪氨酸激酶	鲁斯氏肉瘤
Abl-1	非受体酪氨酸激酶	慢性髓性白血病
raf	MAPKKK，丝氨酸/苏氨酸激酶	腮腺肿瘤
vav	信号转导连接蛋白	白血病
myc	转录因子	Burkitt 淋巴瘤、肺癌、早幼粒白血病
myb	转录因子	结肠癌
fos	转录因子	骨肉瘤
jun	转录因子	
erb-A	转录因子	急性非淋巴细胞白血病
bcl-1	cyclinD1	B 细胞淋巴瘤

早在1911年Rous发现鸡肉瘤无细胞滤液能引起鸡产生新的肉瘤，几十年后，他证实了病原体为罗氏病毒（Rous's sarcoma virus, RSV），为此获得1966年的诺贝尔奖。1970年Temin 和Batimore证实RSV是一种反转录病毒，获1975年诺贝尔奖。

1970s H. Varmus和J. M. Bishop研究小组发现RSV中的致瘤基因是src基因，但是用src的cDNA（complementary DNA）和其他基因组DNA杂交，发现src的同源物普遍存在于动物细胞（如鸡、鸭、果蝇）。原来src编码一种胞质酪氨酸激酶，参与细胞增殖相关的信号转导，是细胞的正常组分。由于RSV、ASV等反转录病毒的基因组是整合在宿主基因组上复制的，会将宿主的某些基因复制到了自身的基因组中，因此被这样的病毒感染的细胞，src基因拷贝就增多了，引起细胞过度增殖。为了区别起见将存在于正常细胞中的癌基因序列称为c-onc，而把存在于病毒中的称为v-onc。从结构上看c-onc是间断的，存在内含子，这是真核基因的特点。而v-onc是连续的，基因跨度较小。

（二）抑癌基因

抑癌基因也称为抗癌基因。早在1960s，有人将癌细胞与同种正常成纤维细胞融合，所获杂种细胞的后代只要保留某些正常亲本染色体时就可表现为正常表型，但是随着染色体的丢失又可重新出现恶变细胞。这一现象表明，正常染色体内可能存在某些抑制肿瘤发生的基因，它们的丢失、突变或失去功能，使激活的癌基因发挥作用而致癌。

抑癌基因的产物是抑制细胞增殖，促进细胞分化，和抑制细胞迁移，因此起负调控作用，通常认为抑癌基因的突变是隐性的。

抑癌基因的产物主要包括（表 16-2）：①转录调节因子，如 Rb、p53；②负调控转录因子，如 WT；③周期蛋白依赖性激酶抑制因子（CKI），如 p15、p16、p21；④信号通路的抑制因子，如 ras GTP 酶活化蛋白（NF-1），磷脂酶（PTEN）；⑥DNA 修复因子，如 BRCA1、BRCA2。⑥与发育和干细胞增殖相关的信号途径组分，如：APC、Axin 等。

抑癌基因失活的途径：①等位基因隐性作用，失活的抑癌基因之等位基因在细胞中起隐性作用，即一个拷贝失活，另一个拷贝仍以野生型存在，细胞呈正常表型。只有当另一个拷贝失活后才导致肿瘤发生，如Rb基因。②抑癌基因的显性负作用（dominant negative）：抑癌基因突变的拷贝在另一野生型拷贝存在并表达的情况下，仍可使细胞出现恶性表型和癌变，并使野生型拷贝功能失活。这种作用称为显性负作用或反显性作用。如近年来证实突变型p53和APC蛋白分别能与野生型蛋白结合而使其失活，进而转化细胞。③单倍体不足假说（Haplo-insufficiency）：某些抗癌基因的表达水平十分重要，如果一个拷贝失活，另一个拷贝就可能不足以维持正常的细胞功能，从而导致肿瘤发生。如DCC基因一个拷贝缺失就可能使细胞粘膜附功能明显降低，进而丧失细胞接触抑制，使细胞克隆扩展或呈恶性表型。

表 16-2 一些抑癌基因的功能

抑癌基因	功能	相关肿瘤
Rb	转录调节因子	RB、成骨肉瘤、胃癌、SCLC、乳癌、结肠癌
p53	转录调节因子	星状细胞瘤、胶质母细胞瘤、结肠癌、乳癌、成骨肉瘤、SCLC、胃癌、磷状细胞肺癌
WT	负调控转录因子	WT、横纹肌肉瘤、肺癌、膀胱癌、乳癌、肝母细胞瘤
NF-1	GAP，ras GTP 酶激活因子	神经纤维瘤、嗜铬细胞瘤、雪旺氏细胞瘤、神经纤维瘤
DCC	细胞粘附分子	直肠癌、胃癌
p21	CDK 抑制因子	前列腺癌
p15	CDK4、CDK6 抑制因子	成胶质细胞瘤
BRCA1	DNA 修复因子，与 RAD51 作用	乳腺癌、卵巢癌
BRCA2	DNA 修复因子，与 RAD51 作用	乳腺癌、胰腺癌
PTEN	磷酯酶	成胶质细胞瘤
APC	WNT 信号转导组分	结肠腺瘤性息肉，结/直肠癌

Rb（人类视网膜细胞瘤）基因是第一个被克隆的抑癌基因。Rb的突变导致视网膜瘤。散发性Rb发生较晚，一般只危及一眼，遗传性Rb往往危及双眼，3岁左右发病形成多个肿瘤（图16-4）。在G_1期Rb与E2F结合，抑制E2F的活性，在G_1/S期Rb被CDK2磷酸化失活而释放出转录因子E2F，促进蛋白质的合成（图16-5）。

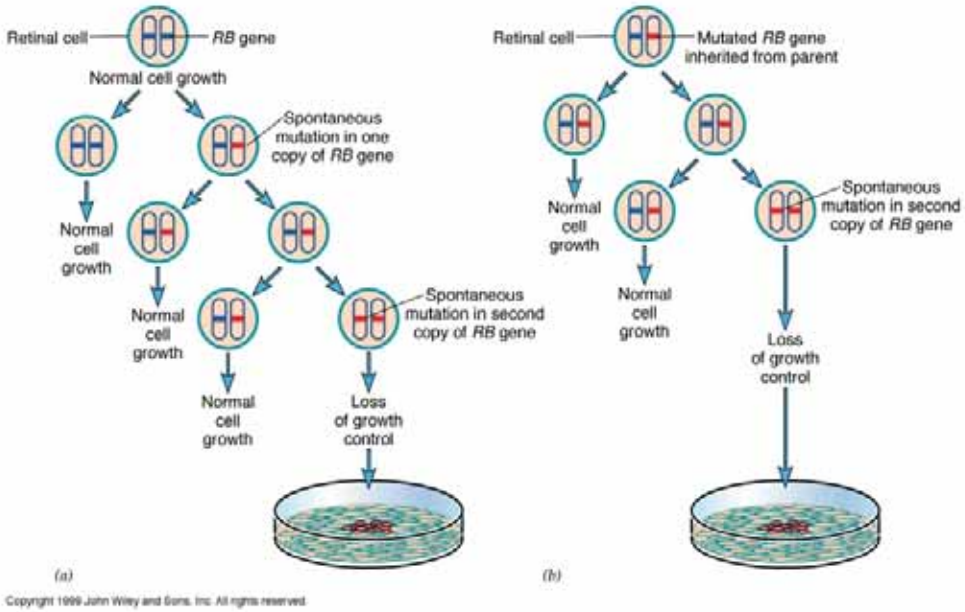


图 16-4 散发性和遗传性 Rb 功能丧失的机理

APC 基因最初是在结肠腺瘤样息肉（adenomatous polyposis coli）病人中发现的，并以此命名。APC 基因定位于染色体 5q21-22，属于 Wnt 信号途径的负调控因子，APC 蛋白可与 β-catenin 连接，促进 β-catenin 降解，而 β-catenin 在细胞内积累后，可进入细胞核，与 T 细胞因子 TCF 结合，促进相关基因的表达。

DCC基因亦称结直肠癌缺失基因（deleted in colorectal carcinoma），氨基酸顺序与神经细胞粘附分子（N-CAM）及其它相关的细胞表面糖蛋白十分相似。该基因失活，可导致细胞的生物学行为，如细胞粘附、接触性抑制及运动发生重要改变，使细胞朝恶性化方向演变，并容易发生转移，DCC基因在胃癌中的缺失率为40%~60%左右。

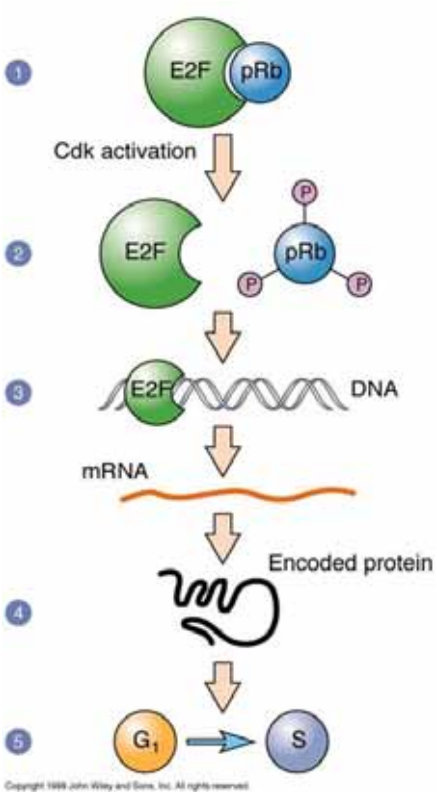


图16-5 Rb基因的作用

（三）原癌基因的激活

恶性肿瘤的发生归根到底是因为原癌基因的激活和抑癌基因的功能丧失，往往涉及多个基因的改变。原癌基因的激活方式多种多样，但概括起来无非是基因本身或其调控区发生了变异，导致基因的过表达，或产物蛋白活性增强，使细胞过度增殖，形成肿瘤（图16-6）。如在肝癌中cyclinA过渡表达，在乳腺癌中常有cyclinA、B、D_1、E等过渡表达。

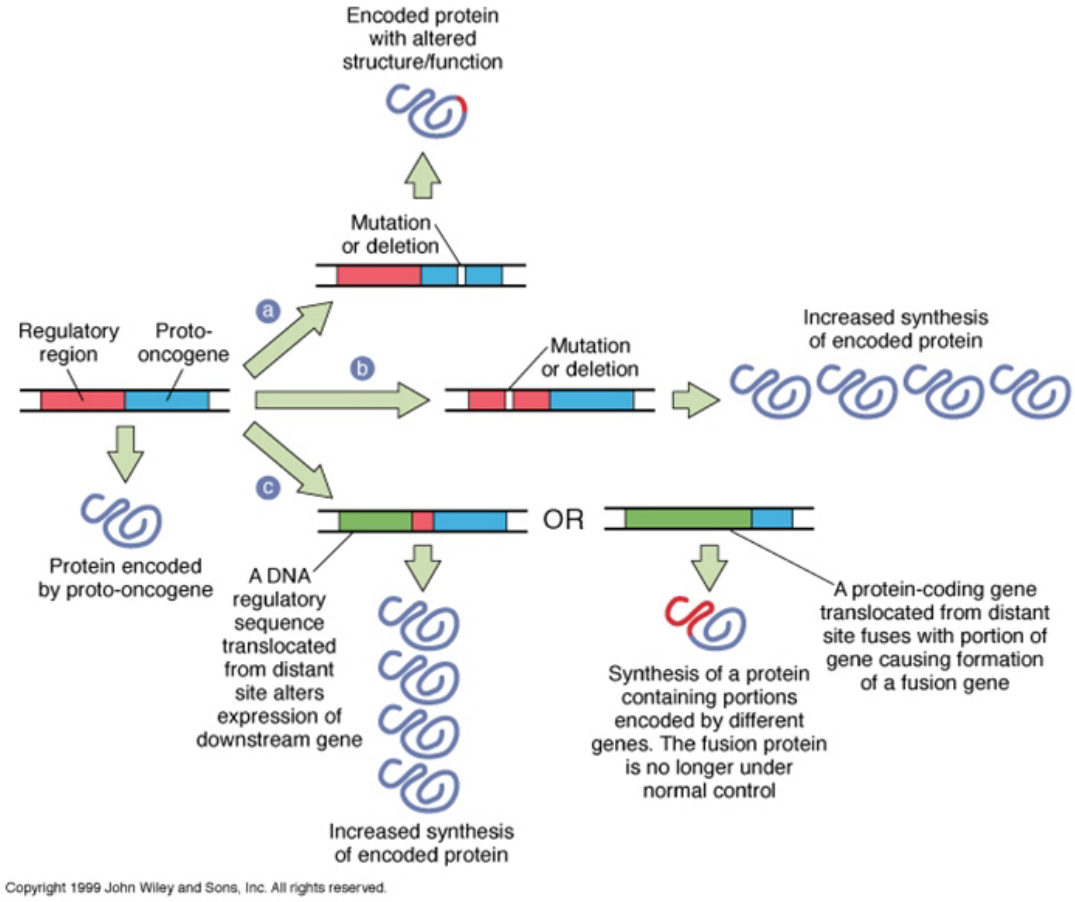


图16-6 原癌基因激活的可能途径

1．点突变

ras基因家族，均以点突变为主，如膀胱癌细胞中克隆出来的c-Ha-ras基因与正常细胞的相比仅有一个核苷酸的差异。

2．DNA重排

原癌基因在正常情况下表达水平较低，但当发生染色体的易位或倒位时，处于活跃转录基因强启动子的下游，而产生过度表达。如Burkitt淋巴瘤细胞的染色体易位，使c-myc与IG重链基因的调控区为邻，由于免疫球蛋白重链基因表达十分活跃，其启动子为强启动子，且在CH-VH之间还有增强子区，致使c-myc过表达。再如在良性甲状旁腺肿瘤患者的染色体中，cyclinD_1基因倒位处于甲状旁腺素基因启动子下游而过渡表达，使细胞出现异常增殖。

染色体易位的主要原因是人类染色体存在着脆性位点，而染色体重排的断裂热点多位于脆性位点。恶性肿瘤的染色体重排是获得性的体细胞变化，而不是发生在生殖细胞内的变化。

3．插入激活

某些不含v-onc的弱转化逆转录病毒，其前病毒DNA插入宿主DNA中，引起插入突变，如逆转录病毒MoSV感染鼠类成纤维细胞后，病毒两端各有一个相同的冗长末端重复序列（LTR），它们不编码蛋白质，而含有启动子、增强子等调控成分，

病毒基因组的LTR整合到细胞癌基因c-mos邻近处，使c-mos处于LTR的强启动子和增强子作用之下而被激活，导致成纤维细胞转化为肉瘤细胞，再如鸟类白血病病毒ALV不含v-onc，但插入c-myc的上游，导致基因过度表达。

4．基因扩增

在某些造血系统恶性肿瘤中，癌基因扩增是一个极常见的特征，如前髓细胞性白血病细胞系和这类病人的白血病细胞中，c-myc扩增8~32倍。癌基因扩增的染色体结构有：①双微体（double minute chromosomes，DMs），无着丝粒，成对分布于细胞中的微小染色体（图16-7）；②均染区（homogenously stained region，HSR），是染色体局部扩增形成的（图16-8）；③姊妹染色单体非均等交换（unequal sister chromatid exchange，USCE），G_2期由于姊妹染色单体之间发生了非均等交换，结果一个子细胞中该染色体较长，具有同源重复（基因扩增），另一个细胞中对应的染色体较短（基因删除）。其中DMS和HSR是最常见的类型，在具有DMS或HSR的直肠癌患者中c-myc mRNA含量是正常人的30倍。

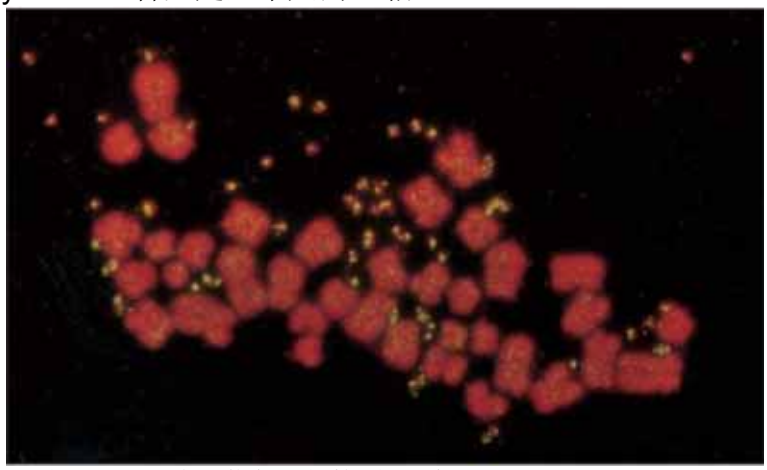


图16-7 Myc基因扩增形成双微体（黄色）的核型 引自Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

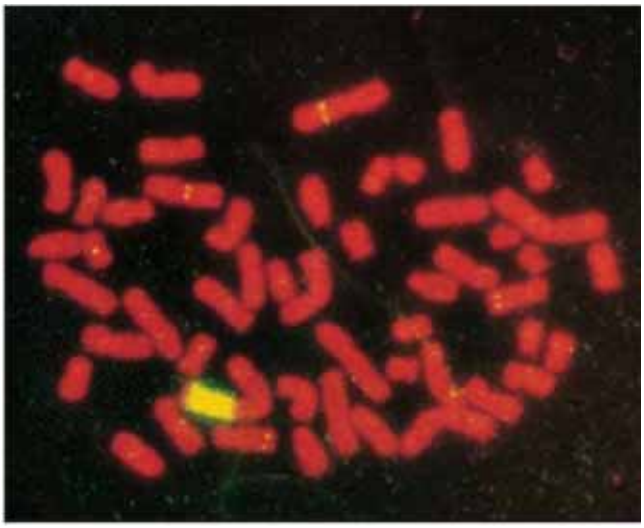


图16-8 Myc基因扩增形成均染区（黄色）的核型 引自Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

5、原癌基因的低甲基化

致癌物质的作用下，使原癌基因的甲基化程度降低而导致癌症，这是因为致癌物质降低甲基化酶的活性。

二、肿瘤形成的外因

人类肿瘤约 80％是由于与外界致癌物质接触而引起的，根据致癌物的性质可将其分为化学、生物和物理致癌物三大类。根据它们在致癌过程中的作用，可分为启动剂、促进剂、完全致癌物。

启动剂是指某些化学、物理或生物因子，它们可以直接改变细胞遗传物质 DNA 的成分或结构，一般一次接触即可完成，其作用似无明确的阈剂量，启动剂引起的细胞改变一般是不可逆的。

促进剂本身不能诱发肿瘤，只有在启动剂作用后再以促进剂反复作用，方可促使肿瘤发生（图 16-9）。例如用启动剂二甲基苯并蒽（dimethytenzanthracene，DMBA）涂抹动物皮肤并不致癌，但是几周后再涂抹巴豆油，则引起皮肤癌，巴豆油中的有效成分是佛波醇酯，能模仿二酰基甘油（DAG）信号，激活蛋白激酶 C。促癌物的种类很多，如某些激素、药物等。有的促癌物只对诱发某种肿瘤起促进作用，而对另一种肿瘤的发生不起作用，例如糖精可促进膀胱癌的发生，但对诱发肝癌不起促进作用；苯巴比妥促进肝癌的发生，但不促进膀胱癌的发生。

有些致癌物的作用很强，兼具启动和促进作用，单独作用即可致癌。称为完全致癌物。如多环芳香烃、芳香胺、亚硝胺、致癌病毒等。

（一）化学致癌物

按化学结构可分为：①亚硝胺类，这是一类致癌性较强，能引起动物多种癌症的化学致癌物质。在变质的蔬菜及食品中含量较高，能引起消化系统、肾脏等多种器官的肿瘤；②多环芳香烃类，这类致癌物以苯并芘为代表，将它涂抹在动物皮肤上，可引起皮肤癌，皮下注射则可诱发肉瘤。这类物质广泛存在于沥青、汽车废气、煤烟、香烟及熏制食品中；③芳香胺类，如乙萘胺、联苯胺、4-氨基联苯等，可诱发泌尿系统的癌症；④烷化剂类，如芥子气、环磷酰胺等，可引起白血病、肺癌、乳腺癌等；⑤氨基偶氮类，如用二甲基氨基偶氮苯（即奶油黄，可将人工奶油染成黄色的染料）掺入饲料中长期喂养大白鼠，可引起肝癌；⑥碱基类似物，如 5-溴尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、2-氨基腺嘌呤等，由于其结构与正常的碱基相似，进入细胞能替代正常的碱基参入到 DNA 链中而干扰 DNA 复制合成；⑦氯乙烯，目前应用最广的一种塑料聚氯乙烯，是由氯乙烯单体聚合而成。大鼠长期吸入氯乙烯气体后，可诱发肺、皮肤及骨等处的肿瘤。通过塑料工厂工人流行病学调查已证实氯乙烯能引起肝血管肉瘤，潜伏期一般在 15 年以上；⑧某些金属，如铬、镍、砷等也可致癌。

化学致癌物引起人体肿瘤的作用机制很复杂。少数致癌物质进入人体后可以直接诱发肿瘤，这种物质称为直接致癌物。大多数化学致癌物进入人体后，需要经过

体内代谢活化或生物转化，成为具有致癌活性的最终致癌物，才能引起肿瘤发生，这种物质称为间接致癌物。在体内参与此类化合物代谢的主要为 P450 酶系。

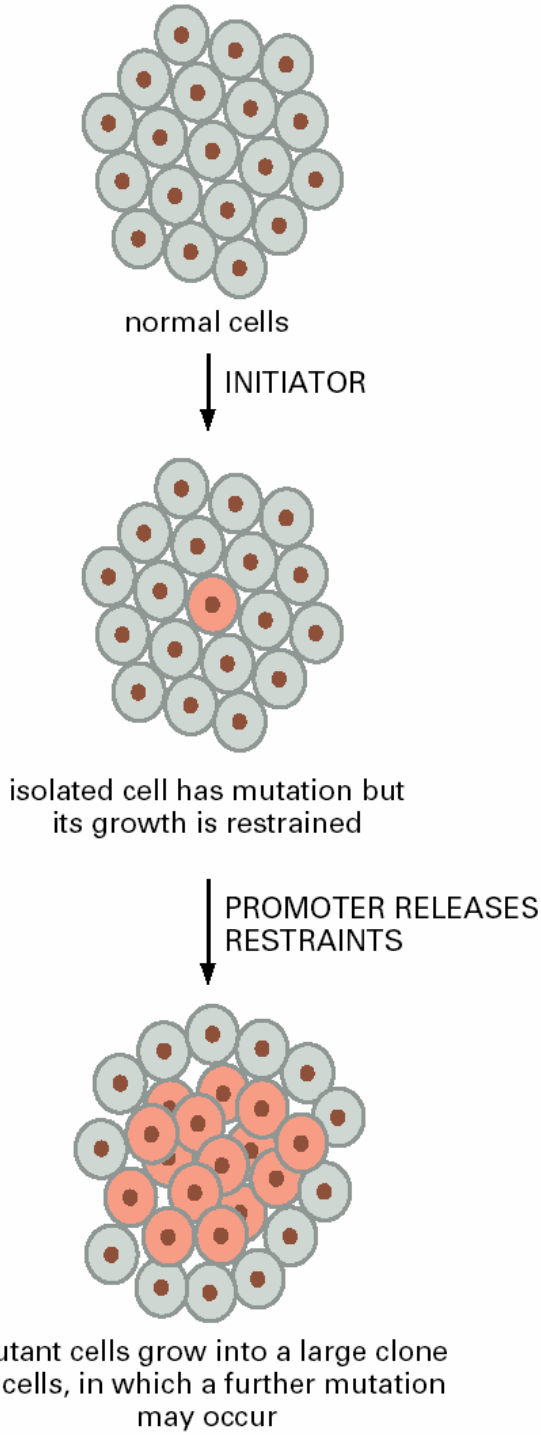


图 16-9 启动与促癌 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

最终致癌物通常为亲电分子，可与 DNA、RNA、蛋白质等生物大分子中的亲核基团发生作用，引起碱基颠换、缺失，DNA 交联、断裂，染色体畸变等。化学致癌

物还可抑制甲基化酶，引起细胞中胞嘧啶的甲基化水平降低，还有可能激活某些癌基因，使细胞癌变。

直接或间接导致 DNA 发生突变的致癌物称为基因毒性致癌物（genotoxic carcinogen），上述提到的化学致癌物均属于此类。但是乳腺癌、前列腺癌和子宫膜癌的致癌物是有激素活性的甾体类化合物，它们并不损伤基因，但能促进细胞分裂，称为非基因毒性致癌物（non-genotoxic carcinogen），如雌二醇可引起卵巢癌和乳腺癌。由此可见并不是所有的致癌物都是诱变剂，当然也并非所有的诱变剂都是致癌的，譬如某也碱基类似物能引起微生物变异，但不引起实验动物的癌症。

（二）生物性致癌因素

生物性致癌因素包括病毒（图 16-10）、细菌、霉菌等。其中以病毒与人体肿瘤的关系最为重要，研究也最深入。

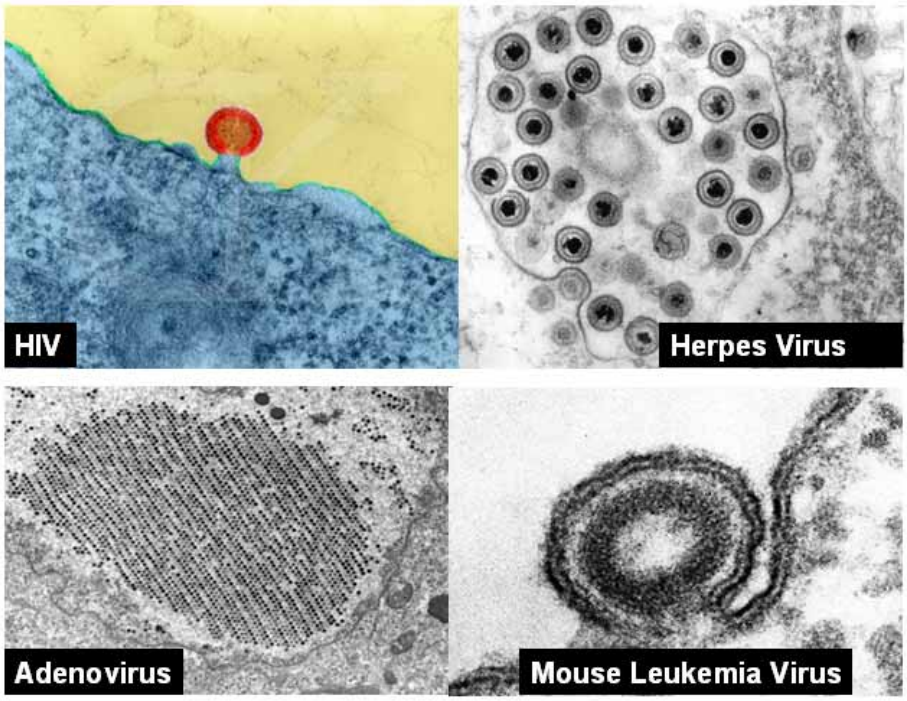


图 16-10 一些肿瘤相关的病毒

1．肿瘤病毒：

与人类肿瘤发生关系密切的有四类病毒：①逆转录病毒（如 T 细胞淋巴瘤病毒，HTLV－I）、②乙型肝炎病毒（HBV）、③乳头状瘤病毒（HPV）和④Epstein－Bars 病毒（EBV），后三类都是 DNA 病毒。

逆转录病毒：引起人类 T 淋巴细胞白血病的人 T 淋巴细胞白血病病毒（HTLV）、成人 T 细胞白血病病毒（ATLV）和爱滋病病毒（HIV）等病毒都属于逆转录病毒。逆转录病毒感染机体后，病毒的遗传信息整合到宿主细胞的染色体中，成为细胞的

组成部分，一般情况下受到正常细胞的调节控制，病毒处于静止状态，但受到化学致癌物、射线辐射等因素的作用后，可能被激活病毒表达而在体内诱发肿瘤。

乙型肝炎病毒：人肝癌细胞 DNA 中发现有 HBV 病毒的碱基序列。体外培养的人肝癌细胞中，见到 HBV 病毒 DNA 整合到细胞 DNA 中。HBV 整合到细胞 DNA 中，能使细胞 DNA 发生缺失、插入、转位、突变或易位等改变。

乳头状瘤病毒：人乳头瘤状病毒（human papilloma virus，HPV）有 50 余种亚型，与生殖道肿瘤的发生有密切关系，并与口腔、咽、喉、气管等处的乳头状瘤和皮肤疣等良性病变有关。在宫颈癌细胞中病毒 DNA 序列已经整合到宿主细胞的基因组中，宫颈癌的发生与原癌基因 c-ras 和 c-myc 的变异有关。

EB 病毒：EB 病毒（Epstein-Barr virus，EBV）是一种疱疹病毒，与儿童的 Burkitt 淋巴瘤和成人的鼻咽癌发生有关。

2．霉菌与肿瘤发生

目前已知有数十种霉菌毒素对动物有致癌性。但除黄曲霉毒素（aflatoxin）外，对其它的研究都较少。黄曲霉菌广泛存在于污染的食品中，尤以霉变的花生、玉米及谷类含量最多。黄曲霉毒素有许多种，是一类杂环化合物，其中黄曲霉毒素 B1 是已知最强的化学致癌物之一，可引起人和啮齿类、鱼类、鸟类等多种动物的肝癌。

（三）物理因素

1．电离辐射

电离辐射可以引起人体各部位发生肿瘤，但据估计在所有肿瘤的总病例数中只占 2%～3%左右。居里夫人的去世，日本原子弹爆炸后引起白血病的发病率增高，都是著名的例子。

辐射可引起染色体、DNA 的突变，或激活潜伏的致癌病毒。放射线引起的肿瘤有：白血病、乳腺癌、甲状腺肿瘤、肺癌、骨肿瘤、皮肤癌、多发性骨髓瘤、淋巴瘤等。

2．紫外线

紫外线照射可引起细胞 DNA 断裂、交联和染色体畸变，紫外线还可抑制皮肤的免疫功能，使突变细胞容易逃脱机体的免疫监视，这些都有利于皮肤癌和基底细胞癌的发生。近年来由于环境恶化，大气层的臭氧减少，出现地球臭氧空洞，地表紫外线的辐照强度将急剧增高，其诱发人体皮肤癌的潜在危险性将大为增加。据估计，大气臭氧减少 1%，皮肤癌就要增加 2-6%。

三、肿瘤的起源与演进

对肿瘤的起源有两种见解，其一是认为来源于去分化的体细胞，其二是认为来源于干细胞。虽然在某些低等动物中已分化的细胞可以去分化[38]，但是在哺乳动物

[38]如切除蝾螈的肢或蜥蜴的尾巴，伤口部位的细胞可以去分化，形成新的失去的结构，再如摘除两栖动物的晶状体，虹膜的细胞就会去分化，形成新的晶状体和虹膜。

中通常已分化的细胞不再具备自我更新（self-renewal）能力，即使发生突变也只是功能异常而不致于转化，而干细胞是一直存在的，并不断更新，突变更容易在干细胞中累积，所以现在普遍倾向于认为肿瘤来源于恶性干细胞。有些组织，如肝、肾虽然不具有干细胞，但是其细胞在特殊情况下也具有分裂能力，因而也是致癌物的靶细胞。

干细胞是体内具有定向分化能力和分裂能力的细胞，如骨髓细胞可以分化出各种血细胞。肿瘤细胞和干细胞有很多相似之处，如：均有自我更新和无限增殖的能力；较高的端粒酶活性；相同的调节自我更新的信号转导途径，如Wnt、Hedgehog、Notch、NF-κB等信号途径（图16-11）。

Hedgehog 信号通道参与早期神经系统发育和毛囊形成的调控。Hedgehog 途径中的抑制物突变后，信号系统活性增高，可诱导中枢神经系统肿瘤的产生，如 Patched 基因突变，可引起 Gorlin's 综合征和小鼠的小脑肿瘤。Notch 信号通路调控造血干细胞的自我更新，通过抑制造血干细胞的特定分化阶段，控制造血干细胞向粒系或淋巴系分化，Notch 信号通路的过度表达可诱导恶性淋巴瘤的产生。在黑色素瘤和一些肠道肿瘤中存在异常 Wnt 信号，尤其是 Wnt 途径的组成成分，如 β-catenine、APC、Axin 等发生基因突变。

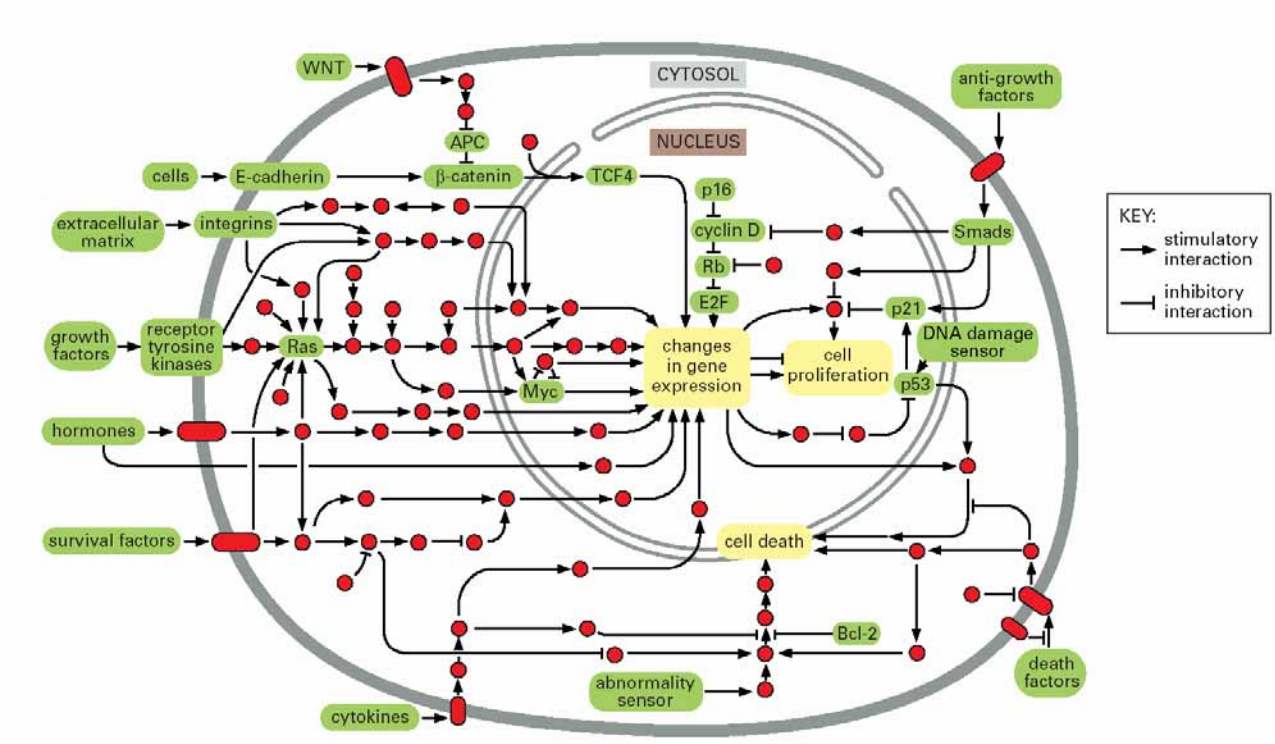


图 16-11 引起肿瘤的信号途径 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

多数肿瘤来源于单克隆细胞，如在女性中，胚胎发育时期，细胞中的一个 X 染色体随机失活，某些 X 染色体连锁的酶（如葡糖-6-磷酸脱氢酶）在组织中具有异质性，即：不同细胞中表达不同的同工酶，而在肿瘤细胞中却是相同的，从这一点上来看一个肿瘤中的细胞具有相同的起源（图 16-12）。

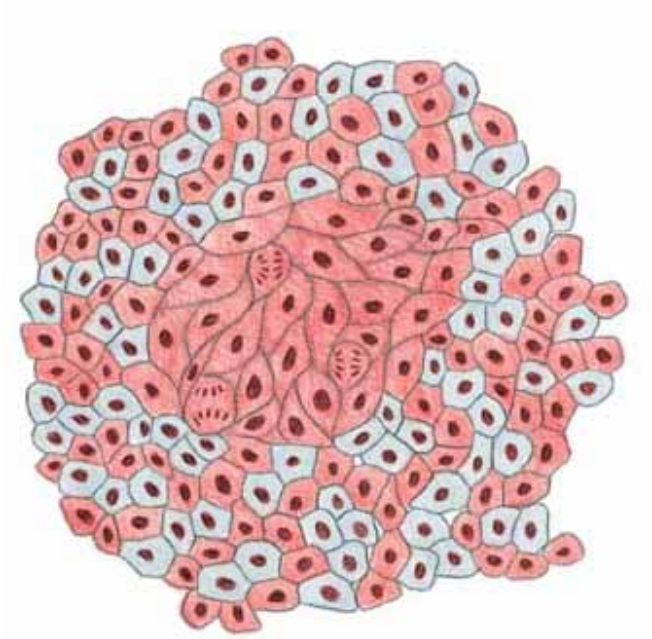


图 16-12 女性巴氏体证明肿瘤起源于单克隆 引自 Molecular Biology of the Cell. 4th ed. 2002

前面提到肿瘤的形成涉及多个基因的突变，因而是一个渐进的复杂过程。多次突变形成肿瘤细胞的异质性，其中少量的细胞具有很强的增值能力，被称为肿瘤干细胞（tumor stem cell）。早在 70 年代 Park 等研究发现从小鼠腹水中分离得到的骨髓瘤细胞移植体内，只有 1%到 4%的骨髓瘤细胞能在脾脏形成克隆，这些骨髓瘤细胞与通常造血细胞一样，只有少量的细胞能形成克隆，这些能形成克隆的骨髓瘤细胞很可能就是骨髓瘤干细胞。

当前肿瘤治疗的目的是尽可能杀死所有肿瘤细胞，认为每个肿瘤细胞都有无限增殖能力，如果肿瘤体积缩小认为治疗方案有效。但实际上大部分肿瘤经过一段时间缓解期后又复发。根据干细胞理论，这种传统的治疗方法并没有将肿瘤干细胞完全杀死，仍具有无限增殖能力。越来越多的学者提出肿瘤治疗应该针对肿瘤干细胞，即使肿瘤体积没有缩小，但由于其他细胞增殖能力有限，肿瘤将逐渐退化萎缩，也许人类能够真正治愈肿瘤。

第三节 肿瘤的诊断与治疗

与其他疾病基本相似，肿瘤的诊断以病史和身体检查为最基本、最重要的诊断手段。身体检查包括 X 射线检查、超声检查、内窥镜检查、组织学活检、血液检查等，这里我们主要讲讲肿瘤标志物。

一、肿瘤标志物

肿瘤标志物（tumor marker）是指由肿瘤组织产生的反映肿瘤自身存在的化学物质。可用于肿瘤的诊断、预后和疗效观察。主要有以下几类：①癌胚蛋白（oncofetal proteins），如甲胎蛋白、癌胚抗原；②肿瘤相关抗原（tumor-associated antigens），如 CA19-9、CA125；③酶（enzyme），如乳酸脱氢酶、神经元特异性烯醇化酶、前列腺酸性磷酸酶；④特殊血浆蛋白（special serum proteins），如 β2-巨球蛋白、本周蛋白；⑤激素（hormone），如降钙素、绒毛膜促性腺激素、促肾上腺皮质激素；此外，原癌基因、抑癌基因及其产物也被越来越广泛地用作肿瘤标志物。

用肿瘤标志物测定肿瘤在临床上已应用了许多年，为临床的诊断和疗效观察起了很多的作用。为了提高诊断的准确性，临床上常将几项相关的标志物组成联合标志物组，同时对某一肿瘤进行检测。

（一）癌胚蛋白

在个体发育中，一些蛋白质只在胎儿期表达，但成年动物细胞发生癌变时，出现去分化现象，一些关闭的基因被激活，重新分泌胚胎时期特有的蛋白，称为癌胚蛋白。

甲胎蛋白（alpha-fetoprotein，AFP）：正常成人血清中含量为 5.8μg/L 以下，男性略高于女性。AFP 由卵黄囊及胚胎肝脏产生，在妊娠 5 个月时达高峰，出生时下降。胎儿出生后 1 年，血清 AFP 应降至正常成人水平。AFP 是原发性肝癌的最灵敏、最特异的肿瘤标志，血清 AFP 测定结果大于 500μg/L 以上，或含量有不断增高者，更应高度警惕。

癌胚抗原（carcinoembryonic antigen，CEA）：为存在于结肠癌及胚胎结肠粘膜上皮细胞的一种糖蛋白。由胎儿胃肠道上皮组织、胰和肝的细胞所合成，通常在妊娠前 6 个月内 CEA 含量增高，出生后血清中含量已很低下，健康成年人血清中 CEA 浓度小于 2.5μg/L。胃肠道肿瘤时因极性消失，CEA 反流入淋巴或血液而而使血清 CEA 升高，当 CEA 高于 20μg/L 时，则意味着可能有消化道肿瘤。

胰胚胎抗原（pancreatic oncofetal antigen，POA）：是一种糖蛋白，正常人群血清中小于 7U/ml。胰腺癌的 POA 的阳性率为 95%，其血清含量大于 20U/ml，当肝癌、大肠癌、胃癌等恶性肿瘤时也会使 POA 升高，但阳性率较低。

（二）肿瘤抗原

肿瘤抗原（carcinomic antigen，CA，也可以写作cancer antigen）是肿瘤细胞膜的结构成分，各不相同，为糖蛋白或糖脂，也叫糖类抗原（carbohydrate antigen，CA）。这类抗原是用单克隆抗体技术从肿瘤细胞系（株）中鉴定出来的，所以在特定肿瘤的诊断方面具有较高的准确性。

CA15-3：由分泌性上皮细胞（如乳腺、肺、胃肠道、子宫的）分泌，正常人排

泄物中也可检出。此抗原虽然没有器官和肿瘤特异性，在乳腺癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌和胃肠道癌中指标均有升高（大于30U/ml），但可作为监测乳腺癌患者术后复发的最佳指标。在其它乳腺疾病和部分孕妇（约8%）中CA15-3也有升高。

CA19-9：是一种糖脂，正常人血清中小于 37U/ml，85％-95％的胰腺癌患者该项指标较高。手术切除肿瘤后，CA19-9 浓度会下降，如再上升，则可表示复发。结直肠癌、胆囊癌、胆管癌、肝癌和胃癌的阳性率也会很高，若同时检测 CEA 和 AFP 可进一步提高阳性检测率。

CA125：是上皮性卵巢癌和子宫内膜癌的标志物，正常人血清中小于 35U/ml。胰腺癌、肝癌、乳腺癌和子宫内膜炎，急性胰腺炎、腹膜炎、肝炎、肝硬化腹水也可使 CA-125 升高，CA-125 升高还与肿瘤复发有关。

CA50：抗原决定簇为唾液酸 Lea 血型物质与唾液酸-N-四氧神经酰胺。正常人血清浓度小于 20U/ml。一般认为，CA50 是胰腺和结、直肠癌的标志物。

PSA：前列腺特异性抗原（prostate specific antigen），是一种丝氨酸蛋白酶，为糖蛋白，发现于前列腺和精浆提取物，是前列腺癌的特异性标志物。正常男性 PSA 含量小于 2.5μg/L。

（三）酶类标志物

肿瘤状态时，机体的某些酶活力或同工酶谱将发生改变，因此检测血清中某些酶的活性是否异常、或同工酶谱是否发生改变，也是肿瘤诊断的重要途径之一。

前列腺酸性磷酸酶（prostatic acid phosphatase，PAP）：酸性磷酸酶是溶酶体的标志酶，前列腺组织中其活性较其他组织种高出 l00-1000 倍。未转移的前列腺癌 PAP 正常或轻度上升。已转移的前列腺癌患者血清中，PAP 活力增加可达正常值几十倍。但前列腺肥大、胃癌、结肠癌、乳腺癌、甲状腺癌、肾癌、卵巢癌、何杰金氏病、多发性骨髓瘤患者的血清中酸性磷酸酶也可有中度升高。

乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）：LDH 总活性在肿瘤患者血清中升高．但许多疾病如心肌梗塞、感染和恶性贫血均可见 LDH 升高。而在恶性淋巴瘤、白血病、卵巢癌患者血清中异常增高。经治疗病情好转时 LDH 下降，复发时又上升。LDH 有 5 种同功酶。在恶性肿瘤时 LDH4 和 LDH5 增高，而 LDH1 和 LDH2 相对减少。原发性肝癌时 LDH5>LDH4，而继发性肝用时则 LDH4>LDH5。

α-L 岩藻糖苷酶（α-L-fucosidase，AFU）：也是一种溶酶体酸性水解酶，是原发性肝癌的一种新的诊断标志物，广泛分布于人体组织细胞、血液和体液中，参与体内糖蛋白、糖脂和寡糖的代谢。原发性肝癌患者血清 AFU 活力显著高于其它各类疾患（包括良、恶性肿瘤）。

碱性磷酸酶（Alkaline phosphatase，ALP）：为糖蛋白，在肝、骨和胎盘组织中合成，是检测原发性骨癌和肿瘤向肝/骨迁移的标志物。

γ-谷氨酰转肽酶（γ-glutamyl transpeptidase，γ-GT），是细胞膜上的糖蛋白，用 4％-30％聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳可将血清 γ-GT 分成 12-13 条酶带。自阳极起其中 I'、II 及 II'酶带为原发性肝癌所特有，对 AFP 阴性肝癌的诊断有一定参考价值。

神经原特异性烯醇化酶（neuron-specific enolase，NSE）：烯醇化酶是糖酵解

的关键酶。有 5 种同工酶，NSE 为神经原和神经内分泌组织特有，是神经母细胞瘤和小细胞肺癌的标志物。

谷胱甘肽 S-转移酶（glutathione S-transferase，GST）：GST 有三种同工酶（α、μ、π），其中 GST-π 可作为消化道恶性肿瘤的标志物。

其它的一些酶：如醛缩酶、半乳糖转移酶、碱性磷酸酶、5'磷酸二酯酶等的同工酶也可作为某些肿瘤的标志物。

端粒酶（telomerase）：是一种反转录酶，可修补端粒序列。在正常机体中除少数干细胞和生殖细胞外，体细胞中端粒酶均处于失活状态，但是几乎在所有肿瘤细胞中均可检测到此酶的活性，因此可作为肿瘤标志物。

（四）激素

非内分泌癌组织中出现激素样物质，称为异位激素。内分泌腺癌使分泌的激素增加，称为原位激素异常。这两种情况均可作为肿瘤诊断的依据。

降钙素（calcitonin，CT）：是 32 个氨基酸组成的多肽激素，甲状腺髓样癌、肺腺癌及小细胞肺癌的病人，血清 CT 明显升高。血清 CT 过高应高度警惕早期肺癌的可能。乳腺癌、肝癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、上颌窦癌、膀胱癌等亦可见 CT 升高。某些良性疾病如甲状腺机能亢进、变形性骨炎和肺部疾患亦发现 CT 升高。

人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin，hCG）：是由胎盘滋养层细胞所分泌的一类糖蛋白类激素，在妊娠和患绒毛膜上皮癌时，hCG 明显增高。hCG 还会在乳腺癌、睾丸癌、卵巢癌增高。当子宫内膜异位症、卵巢囊肿等非肿瘤状态时，hCG 也会增高。

其它激素：人胎盘催乳素（HPL）、促肾上腺皮质激素（ACTH）、生长激素（GH）、甲状腺旁激素（PTH）等。

（五）血浆蛋白

蛋白质肿瘤标志是最早发现的标志物。如 β2 微球蛋白、免疫球蛋白。一般来讲这类标志物特异性稍差，但检测方法相对比较容易，常作常规检测项目。

β2-微球蛋（β2-microglobulin，β2m）：表达在大多数有核细胞表面，是人类白细胞抗原（HLA）的轻链部分。临床上多用于证实淋巴系统肿瘤，如白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤。其水平与肿瘤细胞数量、生长速率、预后及疾病活动性有关。

铁蛋白（ferritin，Fer）：是一种铁结合蛋白，存在于各组织，病理状态下释放入血液中，不是肿瘤特异的标志，在多种癌症患者血液中，均有不向程度的阳性率，肝癌患者的阳性率在 70%以上，所以可辅助诊断肝癌。此外在进展性乳癌患者 Ferritin 水平也有显著提高，且与病程有关。

本周蛋白（Bence-Jones protein，BJP）：1845 年由一位内科医生兼化学病理学家 Henry Bence Jones 首次描述了这种蛋白，为单克隆游离免疫球蛋白轻链（病理状态下，轻链合成过多，则游离于血清中），本周蛋白是多发性骨髓瘤的典型标志物。

二、肿瘤的治疗

治疗肿瘤有两种观点，其一是将患者体内的肿瘤细胞全部清除或至少消灭足够的量，使患者在生存期内肿瘤不再复发；其二是改变癌细胞的特性，使病程减慢甚至完全停止。肿瘤治疗的常规方法有手术、放疗和化疗三种。手术切除肿瘤的治愈率，取决于肿瘤的位置、大小和性质，有些肿瘤长在深部无法触及，或位于要害部位则不能用手术方法治疗。放疗就是用放射线（如 X、γ 射线）杀死肿瘤细胞，可以对肿瘤细胞进行外照射，也可以置入放射源进行体内照射，放疗也会杀上正常的增殖较快的细胞，引起感染、出血、粘膜炎、脱发等。放疗主要是使用 DNA 合成抑制剂（如 5-氟尿嘧啶）或细胞分裂抑制剂（如长春新碱、紫杉酚）之类的细胞毒制剂物来抑制肿瘤细胞，同样对所有分裂细胞具有杀伤作用，因而也会引起上述副作用。目前还有一些新的治疗措施正在研究之中，如抑制血管生成、促进肿瘤细胞分化、免疫治疗、基因治疗等。

谢谢大家！